



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Masteroppgave 2016 60 stp  
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

# **Ankring av *Chlamydia trachomatis* antigener på overflaten av *Lactobacillus plantarum***

Anchoring of *Chlamydia trachomatis* Antigens to the  
Surface of *Lactobacillus plantarum*

Ine Myrbråten  
Bioteknologi



## Forord

Arbeidet som er presentert i denne oppgaven ble utført ved instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige Universitet (NMBU) med Dr. Geir Mathiesen, Professor Vincent Eijsink og Ph.D Katarzyna Kuczkowska som veiledere.

Jeg vil først rekke en stor takk til mine veiledere Geir Mathiesen, Vincent Eijsink og Katarzyna Kuczkowska for god hjelp under arbeidet med denne oppgaven. Katarzyna, en spesiell takk for din hjelp og ditt samarbeid vedrørende det cellebiologiske arbeidet og museforsøket forbundet med denne oppgaven. Geir, du har til enhver tid vært tilgjengelig for å svare på mine mange spørsmål, og din begeistring og kompetanse har vært uvurderlig hele veien.

Jeg vil også takke avdelingsingeniør Lise Øverland. Du har vært en klippe for meg på laben, og har veiledet meg i mye av det praktiske arbeidet. Og en spesiell takk for ditt samarbeid i de semi-kvantitative Western blot-analysene.

Videre vil jeg rette en stor takk til samarbeidsgruppen Statens Serum Institut i København. Deres kompetanse og tidligere forskningsresultater hva gjelder *Chlamydia trachomatis*, bygger mye av grunnlaget for denne oppgaven. Jeg vil også takke gruppen for molekylær cellebiologi ved IKBM, NMBU, og spesielt pH.D Stine Indrelid for veiledning. Jeg vil takke resten av PEP-gruppen og medstudent Arild Steen for å ha bidratt med et godt arbeidsmiljø.

Ås, august, 2016

Ine Myrbråten

## Sammendrag

Dette studiet er en del av et større prosjekt der det langsiktige målet er å utvikle slimhinnevaksiner med melkesyrebakterier som leveringsvektorer. Melkesyrebakterier ansees som gode kandidater til dette formål, da de generelt antas å være trygge for mennesker. Flere arter hevdes å ha helsefremmende og immunmodulerende effekter. De finnes blant annet naturlig i mage-tarmkanalen og vagina hos mennesker, og utviser motstandsdyktighet mot lav pH. *Lactobacillus plantarum* er en av artene som har fått stort fokus som leveringsvektor av antigener, blant annet fordi den kan overleve i mage-tarmkanalen i opp til en uke. Retting av antigener mot bestemte deler av immunforsvaret, samt ulike ruter for vaksineadministrasjon, har betydning for eventuell vaksineeffekt. Det har tidligere blitt vist at peptider rettet mot dendrittiske celler har økt internaliseringen av leveringsvektoren, og at en slik strategi har medført forsterket immunrespons. Denne oppgaven beskriver studier der *L. plantarum* modifiseres for bruk som leveringsvektor av overflateankrede *Chlamydia trachomatis* hybridantigener som er translasjonelt koblet til et dendrittisk cellebindende peptid (DC-pep).

Det foreligger lovende resultater for bruk av hybridantigenene Hirep1- og 2 som vaksinekandidater mot genital klamydiainfeksjon. På bakgrunn av dette ble det konstruert åtte ulike plasmider for ankring av Hirep-baserte antigener til cellemembranen og celleveggen, inkludert versjoner der DC-pep ble translasjonelt koblet til antigenene. Produksjon og overflatelokalisering av antigenene ble stadfestet hos alle de rekombinante *L. plantarum*. Bakteriene ble karakterisert med tanke på vekst og overlevelse etter ulike lagringsmetoder. Forsøk med dendrittiske celler der effekten av DC-pep ble undersøkt kunne ikke avdekke økt opptak som følge av peptidet. Metodikken som ble benyttet er imidlertid relativt ny, og videre optimalisering vil være aktuelt før endelig konklusjon. Et museforsøk ble gjennomført for deteksjon av rekombinante *L. plantarum* i nasale- og vaginale slimhinner etter immunisering. Resultatene indikerte god overlevelse i nasale slimhinner i opp til ett døgn etter immunisering, og dårlig overlevelse i vaginale slimhinner.

Arbeidet beskrevet i denne oppgaven viser vellykket ankring av *C. trachomatis* hybridantigener på overflaten av *L. plantarum*. Basert på karakterisering av de rekombinante bakteriene i dette studiet, samt tidligere forskning, ble det besluttet å benytte membranankret Hirep2-DC i dyreforsøk.

## Abstract

This study is part of a larger project in which the long-term goal is to develop mucosal vaccines with lactic acid bacteria (LAB) as delivery vectors. LAB are considered good candidates for this purpose, as they are generally recognized as safe for humans. Several species are claimed to have health and immunomodulatory effects. LAB are found naturally in the gastrointestinal tract and the vagina of humans, and exhibit resistance to low pH. *Lactobacillus plantarum* is a species that has received great attention as delivery vector of antigens, partly because it can survive in the gastrointestinal tract for up to one week. Targeting of antigens to specific parts of the immune system, as well as various routes for vaccine administration, are important for any vaccine efficacy. It has previously been shown that peptides targeting dendritic cells have led to increased uptake of the delivery vector, and that such a strategy has resulted in enhanced immune response. This thesis describes studies where *L. plantarum* is modified for use as a delivery vector of surface displayed *Chlamydia trachomatis* hybrid antigens that are translationally coupled to a dendritic cell binding peptide (DC-pep).

Previous studies have indicated that the hybrid antigens Hirep1- and 2 are promising as vaccine candidates against genital chlamydia infection. With this knowledge, eight plasmids for anchoring Hirep-based antigens to the cell membrane and cell wall were constructed, and versions with the DC-pep translationally linked to the antigens were included. Production and surface display of antigens was successfully determined for all the recombinant strains of *L. plantarum*. The bacteria were characterized regarding growth and viability after different storage methods. Experiments with dendritic cells where the effect of DC-pep was examined could not reveal increased uptake due to the peptide. The methodology used is relatively new, and further optimization is applicable to draw a final conclusion. A mouse experiment was conducted for detection of recombinant *L. plantarum* in the nasal- and vaginal mucosa after immunization. The results indicated good survivability in the nasal mucosa for up to 24 hours, and poor survivability in the vaginal mucosa.

The work described in this thesis demonstrates successful anchoring of *C. trachomatis* hybrid antigens to the surface of *L. plantarum*. Based on characterization of the recombinant bacteria in this study and previous research, membrane anchored Hirep2-DC was decided to be used in animal trials.

## Forkortelser

AB	«Aberrent bodies»
Alum	Aluminiumhydroksid
ATP	Adenosintrifosfat
BCG	Bacillus Calmette Guerin
BSA	Bovint serumalbumin
CAF01	«Cationic adjuvant formulation 1»
CFU	«Colony forming units»
DC-pep	Dendrittisk cellebindende peptid
dNTP	Deoksinukleotid trifosfat
DTT	Ditiotreitol
EB	«Elementary bodies»
extVD4	«Extended variable domain 4»
FBS	Føtalt bovins serum
FITC	«Fluorochrome fluorescein isothiocyanate»
GFP	«Green fluorescent protein»
GM-CSF	«Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor »
GRAS	«Generally recognized as safe»
Hirep	«Heterologous immunorepeat»
HK	Histidin-proteinkinase
HPV 16	Humant papillomavirus 16
HRP	«Horseradish peroxidase»
Ig	Immunoglobulin
IL-4/10	Interleukin 4/10
LDS	Litium dodecylsulfat
LysM	«Lysin motif»
MHC	«Major Histocompatibility Complex»
MOMP	«Major outer membrane protein»
NEB	«New England BioLabs»
NICE	«Nisin controlled expression»
OFA	«Oncofetal antigen»
PAGE	«Polyacrylamide gel electrophoresis»
PBL	Perifere blodleukocyttter
PCR	«Polymerase chain reaction»
RB	«Reticulate bodies»
RR	Responsregulator
SRP	«Signal recognition particle»
T <sub>H</sub> -celler	T-hjelperlymfocytter
VD4	Variable domain 4

## Innhold

1. INTRODUKSJON .....	1
1.1. Melkesyrebakterier .....	1
1.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	2
1.3. Induserbar ekspresjon i melkesyrebakterier .....	3
1.4. Sekresjon av proteiner i gram-positive bakterier.....	6
1.4.1. Sekresjon av proteiner via Sec .....	6
1.5. Ankring av proteiner i gram-positive bakterier .....	8
1.5.1. Transmembrane proteiner .....	9
1.5.2. Lipoproteiner.....	10
1.5.3. LPXTG-liknende proteiner .....	10
1.5.4. Ikke-kovalent binding av proteiner til celleveggen.....	10
1.6. Det slimhinneassosierte immunforsvaret hos mennesker og vaksiner .....	11
1.6.1. Viktige celler for aktivering av immunrespons.....	13
1.7. Bakterier som levende leveringsvektorer av antigener.....	14
1.8. Den seksuelt overførbare sykdommen klamydia.....	16
1.8.1. <i>Chlamydia trachomatis</i> og dens livssyklus .....	17
1.9. <i>Chlamydia trachomatis</i> antigener benyttet i dette studiet .....	18
1.10. Mål med dette studiet .....	20
2. MATERIALER .....	22
2.1. Laboratoriestyr .....	22
2.2. Kjemikalier .....	23
2.3. Proteiner og enzymer.....	24
2.4. DNA.....	24
2.5. Primere.....	24
2.6. Bakteriestammer og plasmider .....	26
2.7. Kits.....	28
2.8. Agar og medier .....	29
2.9. Buffere .....	30
3. METODE .....	31
3.1. Dyrking av bakterielle kulturer.....	31
3.2. Langtidslagring av bakterier.....	31
3.3. Plasmidisolering fra <i>E. coli</i> .....	32

3.4. Oppkonsentrering av DNA ved vakuumsentrifugering .....	34
3.5. Polymerase kjedereaksjon («Polymerase chain reaction», PCR) .....	34
3.6. Agarose gelelektroforese .....	37
3.7. Ekstrahering av DNA fra agarosegel .....	38
3.8. Kutting av DNA ved bruk av restriksjonsenzymmer og ligering av DNA-fragmenter....	39
3.8.1. Kutting av DNA ved bruk av FastDigest restriksjonsenzymmer .....	39
3.8.2. Bestemmelse av DNA-konsentrasjon.....	40
3.8.3. Ligering av DNA-fragmenter .....	40
3.8.4. In-Fusion kloning .....	41
3.9. Transformering av kjemisk kompetente <i>Escherichia coli</i> .....	43
3.10. Tillaging av elektrokompetente <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1.....	44
3.11. Elektroporering av <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 .....	45
3.12. DNA-sekvensering av plasmider .....	45
3.13. Analysering av genprodukter i <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	46
3.13.1. Kultivering og høsting av <i>L. plantarum</i> .....	46
3.13.2. Preparering av cellelysate ved bruk av glasskuler .....	47
3.14. Gelelektroforese av proteiner .....	47
3.15. Western blot.....	48
3.15.1. Blotting med iBlot® Dry Blotting System .....	49
3.15.2. SNAP i.d.® immundeteksjon .....	50
3.15.3. Tradisjonell metode for antistoffhybridisering .....	51
3.15.4. Deteksjon av proteiner ved kjemiluminescens .....	52
3.16. Frysetørrking av bakterier.....	52
3.17. Deteksjon av overflatelokalisererte antigener .....	53
3.17.1. Farging av celler for strømningscytometri og konfokal laserskanning-mikroskopi .....	54
3.18. Semi-kvantitativ Western blot .....	54
3.18.1. Lysozymbehandling av bakterier .....	55
3.18.2. Semi-kvantitativ Western blot.....	56
3.19. Opptak av rekombinante <i>L. plantarum</i> i dendrittske celler .....	56
3.19.1. Isolering av monocytter med CD14-markøren.....	57
3.19.2. Ko-inkubering av bakterier og dendrittske celler.....	58
3.19.3. Analyse av opptak ved bruk av strømningscytometri .....	59
3.20. Deteksjon av rekombinante bakterier i nasale- og vaginale slimhinner .....	60
4. RESULTATER .....	62
4.1. Konstruksjon av plasmider for celleveggankring av antigener .....	62



4.2. Konstruksjon av plasmider for ankring av antigener til cellemembranen.....	65
4.3. Sammenfatning av konstruerte ekspresjonsvektorer .....	68
4.4. Vekstkurver av <i>L. plantarum</i> med ulike plasmider .....	69
4.5. Deteksjon av antigenproduksjon ved Western blot .....	70
4.6. Deteksjon av antigenenes overflatelokalisering ved strømningscytometri .....	73
4.7. Deteksjon av antigenenes overflatelokalisering ved konfokal laserskanning-mikroskopi .....	75
4.8. Estimering av antigenmengde ved semi-kvantitativ Western blot av cellelysat .....	77
4.9. Frysetørking av induerte <i>L. plantarum</i> .....	81
4.10. Korttidslagring av induerte <i>L. plantarum</i> .....	83
4.11. Opptak av rekombinante <i>L. plantarum</i> i dendrittiske celler .....	87
4.12. Deteksjon av rekombinante bakterier i nasale- og vaginale slimhinner .....	89
5. DISKUSJON .....	92
5.1. Antigener og konstruksjon av plasmider .....	92
5.2. Veksten til rekombinante <i>L. plantarum</i> .....	93
5.3. Analyse av antigenproduksjon ved Western blot .....	93
5.4. Deteksjon av overflateankrede antigener .....	95
5.5. Estimering av antigenkonsentrasjon i en gitt bakteriepopulasjon .....	97
5.6. Lagring av induerte rekombinante <i>L. plantarum</i> .....	98
5.7. Opptak av rekombinante <i>L. plantarum</i> i dendrittiske celler .....	99
5.8. Deteksjon av rekombinante bakterier i nasale- og vaginale slimhinner .....	100
5.9. Konklusjoner og fremtidige perspektiver .....	102
6. REFERANSER .....	104
Vedlegg .....	112

### 1. INTRODUKSJON

Melkesyrebakterier har blitt benyttet i matproduksjon i tusener av år, blant annet til konservering av mat og til fremstilling av ulike meieriprodukter. Melkesyrebakterier inngår som en naturlig del av tarmfloraen hos mennesker, og mange arter antas å ha ulike helsefremmende og probiotiske egenskaper. De siste par tiårene har bruken av melkesyrebakterier som levende leveringsvektorer av slimhinnevaksiner vært gjenstand for omfattende forskning. Dette på bakgrunn av deres motstandsdyktighet mot lav pH, samt at mange arter anerkjennes som trygge.

*Chlamydia trachomatis* er en gram-negativ bakterie som forårsaker den seksuelt overførbare sykdommen klamydia. Infeksjonstilstanden er ofte symptomfri, men vedvarende infeksjon kan medføre alvorlige reproduksjonskomplikasjoner da ubehandlet infeksjon kan gi bekkenbetennelse som videre kan forårsake infertilitet. Klamydia er en av de mest utbredte seksuelt overførbare sykdommene, og i et samfunnsøkonomisk perspektiv knyttes store kostnader til blant annet screening og behandling. En vaksine mot klamydia ansees som desidert beste utvei for å redusere antallet klamydiainfeksjoner på verdensbasis. Denne oppgaven beskriver studier der *Lactobacillus plantarum* modifiseres for bruk som levende leveringsvektor av *Chlamydia trachomatis* hybridantigener rettet mot dendritiske celler i slimhinnene.

#### 1.1. Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier (Lactobacillaceae) er en familie med gram-positive bakterier med et lavt GC-innhold. De er aerotolerante, danner ikke sporer, og er staver eller kokker som gjenkjennes ved dannelsen av melkesyre etter fermentering av karbohydrater.

Melkesyrebakterier fermenterer karbohydrater ved to ulike reaksjonsveier, der den homofermenterende reaksjonsveien gir melkesyre som sluttprodukt, og den heterofermenterende gir sluttproduktene melkesyre, CO<sub>2</sub>, eddiksyre og/eller etanol (Makarova et al. 2006). Noen melkesyrebakterier finnes naturlig i bakteriefloraen i mage-tarmkanalen og i vagina hos dyr og mennesker. Andre naturlige habitater er ulike matprodukter som kjøtt, grønnsaker og melk (Daniel et al. 2011).

Konservering av matprodukter med bruk av melkesyrebakterier (på grunn av lav pH forårsaket av melkesyre), er en metode som går langt tilbake i tid. De siste tiårene har slik konservering fått økt fokus igjen, da antimikrobielle bacteriosiner produsert av melkesyrebakterier antas å kunne erstatte kjemiske konserveringsstoffer i matprodukter. Nisin er en type bacteriosin, og er foreløpig det eneste som er godkjent som bruk til konserveringsmiddel i mat (Ramu et al. 2015; Soomro et al. 2002). Inntak av melkesyrebakterier antas i tillegg å ha positive effekter på bakteriefloraen i mage-tarmkanalen, spesielt de artene som evner å kolonisere tarmepitelet. De positive effektene tilskrives konkurranse mot patogene mikroorganismer, stimulering av immunsystemet, og reduksjon i risikoen for allergiske reaksjoner (Herich & Levkut 2002; Wyszynska et al. 2015).

Mange melkesyrebakterier har blitt anerkjent som trygge og har mottatt en såkalt GRAS-status («generally recognized as safe») fra den amerikanske mat og legemiddel administrasjonen (FDA). Bakterienes motstandsdyktighet mot lav pH (som er et faktum i mage-tarmkanalen og i vagina), i kombinasjon med GRAS-statusen, gjør melkesyrebakterier til lovende kandidater som leveringsvektorer av slimhinnevaksiner (Wyszynska et al. 2015). I tillegg har Mohamadzadeh et al. (2009) vist at bruk av melkesyrebakterier som leveringsvektor, der antigenet er rettet mot dendrittiske celler i slimhinnen, kan indusere en bedre immunrespons. De benyttet peptidet FYPSYHSTPQRP (Curiel et al. 2004) som er kjent for å kunne binde dendrittiske celler fra mus og mennesker. Det dendrittisk cellebindende peptidet (DC-pep) ble koblet til et antigen fra *Bacillus anthracis*, og leveringsvektoren var *Lactobacillus acidophilus*. Mus som ble oralt vaksinert med antigen-DC-pep var bedre beskyttet mot *B. anthracis* infeksjon sammenliknet med mus som ble oralt vaksinert med antigen uten DC-pep.

## **1.2. *Lactobacillus plantarum***

*L. plantarum* er en fakultativ heterofermentativ bakterieart som utviser stor allsidighet. Den er funnet i mange ulike habitater, og har blant annet blitt isolert fra meieriprodukter, kjøtt og fermenterte grønnsaker. *L. plantarum* er en av få arter fra slekten *Lactobacillus* som i tillegg til å inngå i matproduksjon, også finnes som en naturlig bestanddel i mage-tarmkanalen hos mennesker (Ahrné et al. 1998; Kleerebezem et al. 2003). *L. plantarum* antas å være en art som passerer, og ikke nødvendigvis koloniserer, mage-tarmkanalen hos mennesker (Derrien & van Hylckama Vlieg 2015). Noen stammer av denne arten hevdes også å besitte probiotiske

egenskaper som skal gi helsefremmende effekter hos verten (Cunningham-Rundles et al. 2000; De Vries et al. 2006). For eksempel gav Herias et al. (1999) sine resultater indikasjoner på at *L. plantarum* konkurrerte med *Escherichia coli* for kolonisering av tarmen hos rotter, og at *L. plantarum* kunne ha immunmodulerende effekter.

Genomsekvensen til *L. plantarum* WCFS1 ble bestemt av Kleerebezem et al. (2003), og resultatet avslørte bakteriens evne til å importere og utnytte en rekke sukkerarter. Det ble også påvist mange ulike sekreterte og overflateankrede proteiner. Disse funnene stemmer overens med bakteriens fleksibilitet og evne til å adaptere seg til ulike habitater, der interaksjoner med ulike substrater via overflateankrede proteiner og mulighetene til å utnytte mange ulike karbonkilder, underbygger artens tilpasningsdyktighet (Kleerebezem et al. 2003).

### **1.3. Induserbar ekspresjon i melkesyrebakterier**

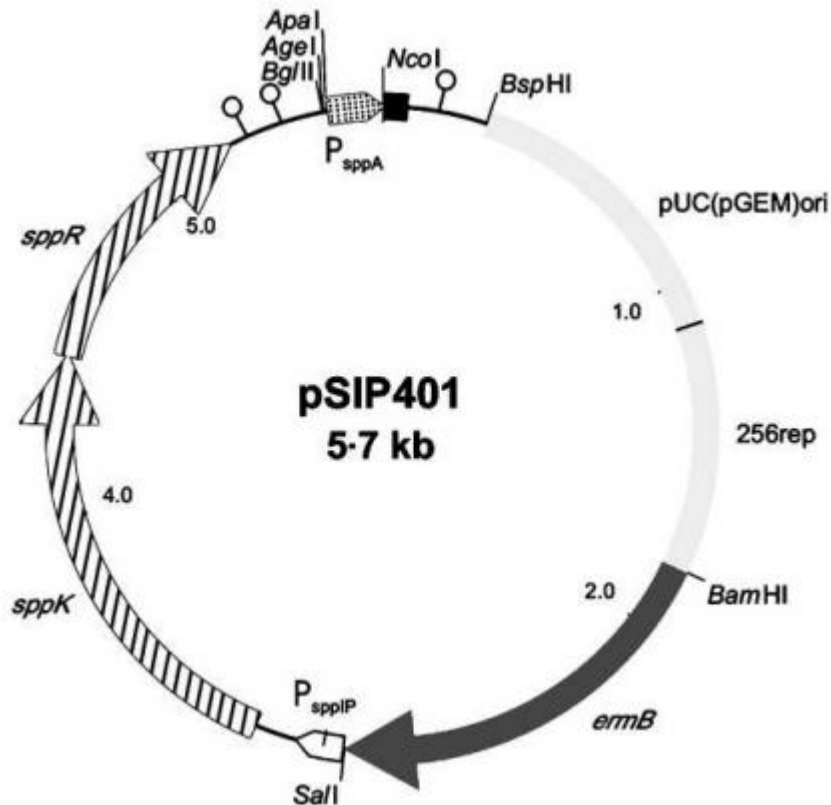
Mye forskning har blitt utført for å utvikle effektive systemer for heterolog proteinekspresjon, -sekresjon og -overflateankring i melkesyrebakterier (Bermúdez-Humarán et al. 2011; Dieye et al. 2001; Fredriksen et al. 2010; Steidler et al. 2003; Wells 2011). Det har blitt utviklet ulike typer ekspresjonssystemer for bruk i melkesyrebakterier, blant annet et nisin-kontrollert ekspresjonssystem («nisin controlled expression», NICE) som ble utviklet av De Ruyter et al. (1996) for bruk i *Lactococcus lactis*, og pSIP-systemet (Sørvig et al. 2003; Sørvig et al. 2005), hovedsakelig for bruk i *Lactobacillus sakei* og *L. plantarum*. NICE-systemet har også blitt videreutviklet for å kunne benyttes i andre arter (Kleerebezem et al. 1997; Mierau & Kleerebezem 2005; Pavan et al. 2000). Ved bruk av NICE-systemet i *L. plantarum* har det imidlertid blitt påvist en betydelig produksjon av målproteiner selv uten indusering, det vil si at det er en basalproduksjon av proteinet uten induksjon med nisin (Pavan et al. 2000; Sørvig et al. 2003). Et ideelt ekspresjonssystem tillater induserbar overproduksjon av målproteiner, mens basalproduksjonen holdes lavest mulig. Et slikt system muliggjør ekspresjon av proteiner som eksempelvis er toksisk for produsenten selv.

Mange melkesyrebakterier produserer ulike antimikrobielle peptider, kalt bacteriosiner. Produksjonen av slike bacteriosiner reguleres ofte gjennom kommunikasjonsmekanismer mellom cellene i en populasjon, via en såkalt «quorum-sensing»-mekanisme, som avhenger av sekreterte peptidferomoner (Eijsink et al. 2002; Quadri 2002). Feromonene virker på et to-komponents reguleringsystem som består av en membranbundet histidin-proteinkinase (HK)

og en intracellulær responsregulator (RR). Bacteriosiner fra melkesyrebakterier kan deles inn i flere klasser, men de vanligste er klasse I og klasse II. Lantibiotika (antimikrobielle peptider som inneholder den spesielle aminosyren lanthionin (Schnell et al. 1988)) er eksempel på klasse I bacteriosiner, hvor nisin er et eksempel som inngår i denne gruppen (Kuipers et al. 1995). Klasse II består av små, varmem stabile peptid-bacteriosiner som ikke inneholder aminosyren lanthionin. Produksjonen av bacteriosiner fra de to klassene foregår ved to ulike metoder. Ved produksjon av bacteriosiner av klasse I, for eksempel nisin, opptrer nisin selv som feromonet som induserer videre produksjon av nisin (Kuipers et al. 1995). Derimot hos bacteriociner av klasse II, vil et separat produsert peptidferomon inducere produksjon. Peptidet blir vanligvis transkribert sammen med genene for HK og RR og vil aktivere systemet når mengden feromon når en viss mengde i omgivelsene (Brurberg et al. 1997).

Sørvig et al. (2003) konstruerte det såkalte pSIP-systemet for kontrollerbar ekspresjon i *Lactobacillus sakei* og *L. plantarum*. Systemet benytter de regulerbare promotorene som opprinnelig styrer produksjonen av bacteriosinene sakacin A og P, og genene som koder for en transmembran histidin-proteinkinase (HK) og en responsregulator (RR). Videre vil systemet som benytter promotorene og genene for naturlig produksjon av sakacin P forklares.

Ekspresjonssystemet er bygd opp av genkassetter som muliggjør enkel utbytting av de ulike delene ved bruk av restriksjonszymer og ligering (Figur 1.1). Systemet virker ved at peptidferomonet nødvendig for produksjon av sakacin P, SppIP (Eijsink et al. 1996), blir tilsatt i vekstmediet. Dette fører til at HK blir fosforylert, og fosfatgruppen blir videre overført til RR som dermed blir aktivert. Aktiveringen medfører at RR binder til spesifikke sekvenser i promotorene  $P_{sppIP}$  og  $P_{sppA}$  (Fig 1.1). Denne bindingen induserer transkripsjon av målproteinet som har blitt satt inn nedstrøms for sakacin P promotoren ( $P_{sppA}$ ). Induksjonssignalet forsterkes videre ved økt transkripsjon av HK og RR på grunn av aktivert  $P_{sppIP}$ . Dette fører til en selvgående induksjonsloop og dermed en eksplosiv produksjon av målproteinet. Hele systemet ligger under streng kontroll ved at induksjon krever tilsetning av det ekstracellulære feromonet SppIP, siden *sppIP* genet er fjernet i pSIP-vektorene (Sørvig et al. 2003).



**Figur 1.1. Grafisk illustrasjon av plasmidet pSIP401.** Lysegrå regioner, replikon pUC(pGEM)ori fra *E. coli* og replikon 256 fra *L. plantarum*; mørkegrå region, resistensgenet for Erytromycin; hvit region, den induserbare promotoren  $P_{sppIP}$ ; regioner med vertikal stiplet linje, genene for histidin-proteinkinase og responsregulator; prikkete region, den induserbare promotoren  $P_{sppA}$ ; svart boks, multipelt kloningssete. Et målgen kan translasjonelt fusjoneres til promotoren  $P_{sppA}$  ved bruk av *NcoI*. Figuren er hentet fra Sørvig et al. (2005).

Senere modifiserte Mathiesen et al. (2008) pSIP401 vektoren (Figur 1.1.) til å kunne benyttes for sekresjon av proteiner. Da ble restriksjonssetet *NcoI* (Figur 1.1.) erstattet med *NdeI*, mens *SalI* ble innført i regionen mellom signalpeptidet og det sekreterte proteinet. *SalI* i promotoren  $P_{sppIP}$  (Figur 1.1.) ble fjernet. Fordelen med *NdeI* fremfor *NcoI* er at translasjonelle koblinger kan lages uten og eventuelt måtte endre det andre kodonet i målgenet. Dette systemet ble videreutviklet for konstruksjon av vektorer for ankring av heterologe proteiner på celleoverflaten (Fredriksen et al. 2010; Fredriksen et al. 2012). Sekvensene til ankringsproteiner ble da kombinert med sekvensene til målproteiner. Dette medførte ankring av målproteinene til celleveggen eller til cellemembranen. Ankring av proteiner i gram-positive bakterier er beskrevet i seksjon 1.5.

## 1.4. Sekresjon av proteiner i gram-positive bakterier

Gram-positive bakterier har et tykt lag av peptidoglykan som omslutter cellemembranen, mens gram-negative bakterier har et tynt lag med peptidoglykan, etterfulgt av en ytre membran. Denne forskjellen har betydning med tanke på sekresjon av proteiner, da sekresjon krever translokasjon over membraner etter syntetiseringen i cytosol. Prosessen er i utgangspunktet enklere hos gram-positive bakterier med bare en cellemembran, enn hos de gram-negative bakteriene hvor proteinene må transporteres over to membraner. Denne egenskapen kan favorisere bruk av gram-positive bakterier vedrørende sekresjon og/eller overflateankring av heterologe proteiner, sammenliknet med gram-negative bakterier.

I gram-positive bakterier er det identifisert syv ulike mekanismer for proteinsekresjon: Sec («secretion»), Tat («twin-arginine translocation»), FEA («flagella export apparatus»), FPE («fimbriin-protein exporter»), Holin (poredannende), ABC-transportører (“peptide-efflux ABC transporters»), og Wss («WXG100 secretion system») (Kleerebezem et al. 2010). Kleerebezem et al. (2010) undersøkte tilstedeværelsen av proteiner som inngår i disse reaksjonsveiene, ved sekvenshomologi- og proteindomenesøk, hos 13 publiserte genomer av lactobacilli, deriblant *L. plantarum*. De fant at alle disse 13 genomene kodet for proteiner som inngår i reaksjonsveiene for Sec, FPE, ABC-transportør og holin, men ikke for Tat, FEA og Wss.

De fleste proteiner blir sekretert via Sec-systemet (Figur 1.3.) og det er også dette systemet som benyttes mest når man benytter gram-positive bakterier til heterolog sekresjon (seksjon 1.4.1.). Proteinene som fraktes ut via Sec systemet merkes for denne sekresjonsveien ved et N-terminalt signalpeptid som kløyves av etter fullført translokasjon (Driessen & Nouwen 2008).

### 1.4.1. Sekresjon av proteiner via Sec

Som nevnt merkes proteiner for Sec ved et N-terminalt signalpeptid. Sekvensen til signalpeptidet har en tredelt struktur; et N-domene med 1-3 positivt ladede aminosyrer, et H-domene som utgjør en hydrofobisk kjerne på 10-15 aminosyrer, og et polart C-domene med kuttsete for signalpeptidase (Figur 1.2.) (Driessen & Nouwen 2008).

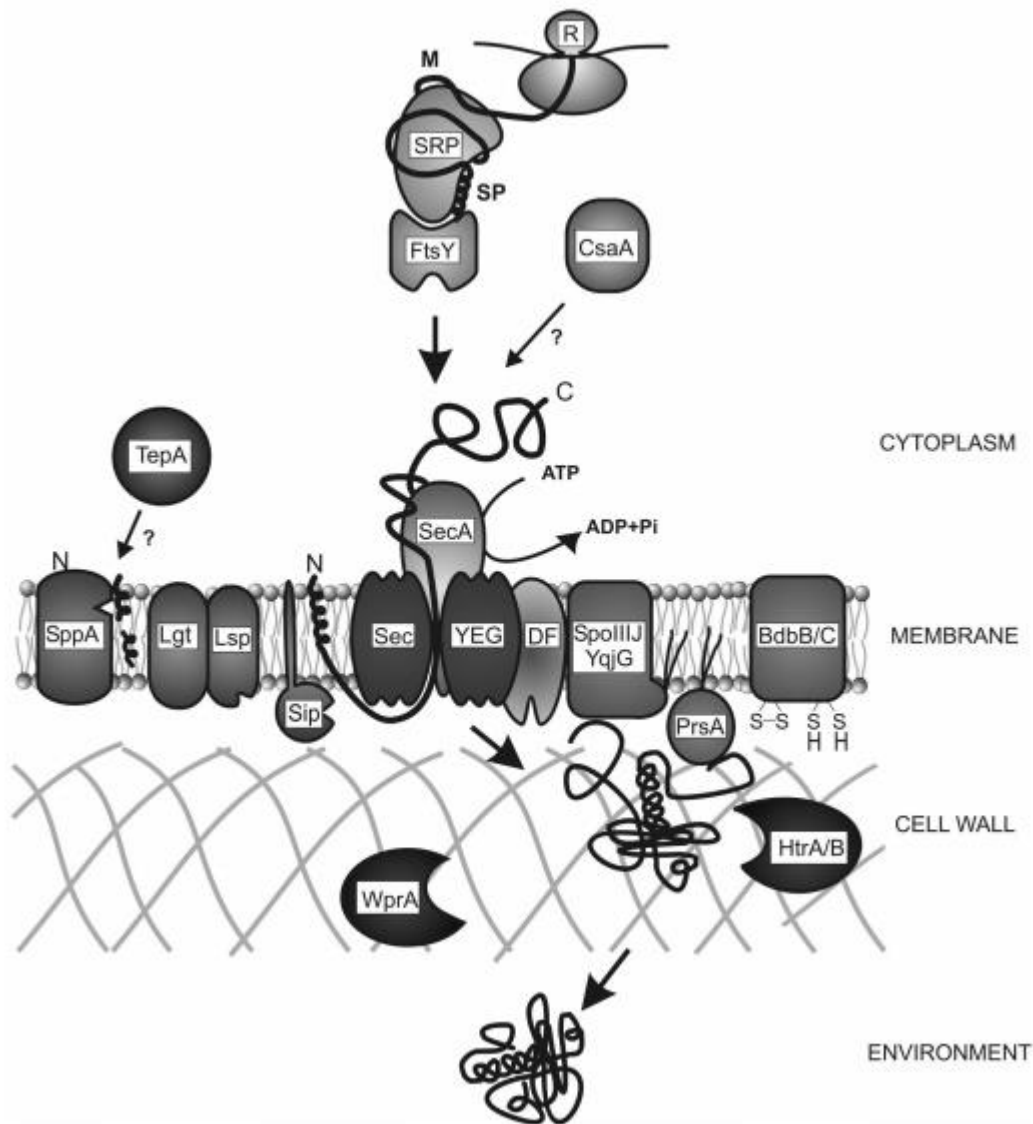


**Figur 1.2. Skjematisk oversikt over signalpeptid for sekresjon av proteiner via Sec.** Signalpeptidet viser en tredelt struktur med et N-domene, H-domene og C-domene (se tekst for detaljer). Heliksbrytende aminosyrer (glysin og prolin) i H-domenet er indikert. Den vanligste forekommende første aminosyren i det ferdige proteinet (+1), alanin, er også indikert. Figuren er modifisert fra Tjalsma et al. (2004).

I Figur 1.3. vises en skjematisk illustrasjon av Sec-systemet og dens komponenter. Sec-translokasen består av en proteinførende kanal som er integrert i cellemembranen (SecYEG, består av SecY, SecE og SecG) og et ATPase motorprotein (SecA). En signalgjenkjenner partikkel («signal recognition particle», SRP) gjenkjenner den N-terminale signalsekvensen til proteiner som skal sekreteres (Figur 1.3.). Proteinets FtsY binder deretter komplekset signalpeptid-SRP, og bidrar med å stabilisere forløper-proteinets til det når Sec-translokasen (SecYEG og SecA). Motorproteinets SecA hydrolyserer deretter adenosintrifosfat (ATP) slik at forløper-proteinets drives gjennom den proteinførende kanalen SecYEG. Hydrolysen av ATP medfører at SecA frigjør seg fra proteinets som føres gjennom SecYEG. Fullstendig translokasjon gjennom kanalen beror på gjentatte sykliske ATP-hydrolyse av SecA, samt proton-drivkraften over membranen (Driessen & Nouwen 2008; Kleerebezem et al. 2010; Tjalsma et al. 2004).

En signalpeptidase kutter av signalpeptidet underveis eller rett etter translokasjonen er gjennomført. Signalpeptidase type I gjenkjenner kuttsetet A-x-A (van Roosmalen et al. 2004), mens signalpeptidase type II gjenkjenner kuttsetet L-x-x-C, som omtales som en lipoboks (Sutcliffe & Harrington 2002). Signalpeptidase type II medfører at proteinets blir forankret i cellemembranen (seksjon 1.5.2.), mens kutting med signalpeptidase I gjør at proteinets sekreteres. I sistnevnte tilfelle kan proteinets likevel holdes tilbake i cellemembranen eller celleveggen ved at proteinets mangler kuttsetet for signalpeptidase (seksjon 1.5.1.).





**Figur 1.3. Skjematisk oversikt over Sec-systemet og involverte komponenter.** Proteiner som skal sekreteres blir syntetisert på ribosomer som forløper-proteiner med et N-terminalt signalpeptid. En signalgjenkjennende partikkel («signal recognition particle», SRP) binder signalpeptidet på forløper-proteinet. Proteinet FtsY binder SRP og virker stabiliserende under transporten av forløper-proteinet til Sec-translokasen. Sec-translokasen er et proteinkompleks integrert i cellemembranen som består av et ATP-drevet motorprotein (SecA) og den proteinførende kanelen SecYEG. Under eller rett etter translokasjonen vil signalpeptidaser kutte av signalpeptidet. For flere detaljer om øvrige komponenter i figuren, se Tjalsma et al. (2004). Figuren er hentet fra Tjalsma et al. (2004).

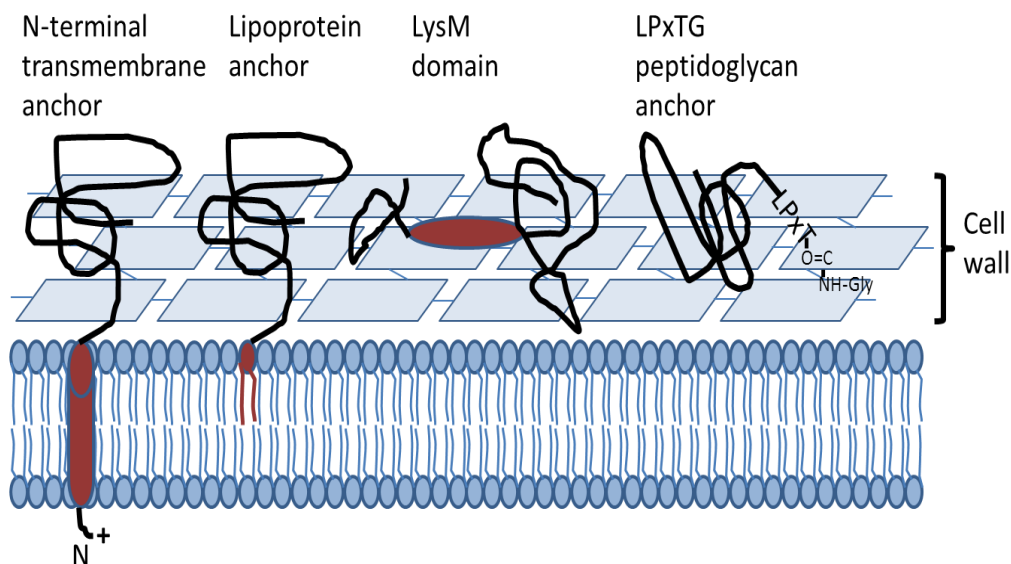
### 1.5. Ankring av proteiner i gram-positive bakterier

Gram-positive bakterier benytter flere ulike mekanismer for å overflateankre proteiner, enten til cellemembranen eller peptidoglykanlaget (celleveggen). Grunnprinsippene for overflateankring bygger imidlertid på to ulike metoder; kovalent binding til overflatekomponenter eller ikke-kovalent interaksjon til cellemembranen eller komponenter

av celleveggen (Michon et al. 2016). De ulike mekanismene for overflateankring deles vanligvis inn i fire kategorier (Fig. 1.4.) (Desvaux et al. 2006):

1. Transmembran ankring av proteiner
2. Ankring via lipoproteiner
3. LPxTG-liknende motiver for ankring
4. Ikke-kovalent binding av proteiner til celleveggen

Figur 1.3. viser en skjematisk illustrasjon av de ulike ankringsmekanismene. Transmembrane ankre kan være ankret både N-terminalt og C-terminalt, men N-terminal, transmembran ankring (vist i Figur 1.4.) er vanligst (Boekhorst et al. 2006).



**Figur 1.4. Oversikt over de ulike ankringsmekanismene.** Skjematisk fremstilling av de mest benyttede ankringsmekanismene, som er basert på kovalente og ikke-kovalente bindinger til cellemembranen og celleveggen. Bindingsmotivene/-domenene er fremhevet i rødt. Figuren er hentet fra Michon et al. (2016).

### 1.5.1. Transmembrane proteiner

Mange proteiner som sekreteres merkes med et N-terminalt signalpeptid for sekresjon gjennom Sec-systemet (seksjon 1.4.1. og Figur 1.2. og 1.3.). Noen av disse proteinene mangler et kuttsete for signalpeptidase i C-domenet av signalsekvensen, hvilket betyr at signalpeptidet ikke fjernes for frigjøring av proteinet til omgivelsene. Som nevnt i seksjon 1.4.1. inneholder slike signalpeptider et H-domene med 10-15 hydrofobe aminosyrer, og i tilfeller hvor signalpeptidet ikke kuttes av fungerer H-domenet som en N-terminal, transmembran heliks som ankrer proteinet til cellemembranen (Michon et al. 2016). I L.

*plantarum* er N-terminale transmembrane proteiner antatt å være den største klassen av de overflateankrede proteinene (Boekhorst et al. 2006; Kleerebezem et al. 2010).

### **1.5.2. Lipoproteiner**

Lipoproteiner er proteiner som blir ankret til utsiden av membranen via lipidhodet i cytoplasmamembranen. Det N-terminale signalpeptidet hos lipoproteiner inneholder et konserverte motiv ([L-(A/S)-(A/G)-C]), som kalles en lipoboks, i den C-terminale delen av signalpeptidet (Tjalsma et al. 2000; von Heijne 1989). Lipoproteinene translokteres gjennom Sec-systemet, hvor sekresjonen etterfølges av en koblingsreaksjon, katalysert av enzymet diacylglycerol transferase, mellom en fosfolipid i membranen og en konserverte cystein i lipoboks-motivet. En signalpeptidase som er spesifikk for lipoboks-motivet, signalpeptidase II, kutter deretter av signalpeptidet N-terminalt for den modifiserte cystein-aminosyren. Proteinene blir på denne måten festet med den N-terminale enden kovalent til en fosfolipid i cellemembranen (Figur 1.4.) (Hutchings et al. 2009; Kleerebezem et al. 2010; Michon et al. 2016; Prágai et al. 1997).

### **1.5.3. LPXTG-liknende proteiner**

Kovalent ankring til celleveggen hos gram-positive bakterier skjer ved hjelp av et såkalt C-terminalt LPXTG-liknende motiv (Figur 1.4.) (Fischetti et al. 1990). LPXTG-ankrede proteiner har en N-terminal signalsekvens som medfører translokasjon over cellemembranen via Sec-systemet. I det C-terminale ankeret finnes sekvensmotivet (LPXTG), etterfulgt av hydrofobe aminosyrer og en hale med positivt ladede aminosyrer. Etter sekresjonen vil enzymet sortase (SrtA) kløyve peptidbindingen mellom treonin og glysin i sekvensmotivet. Dette medfører kovalent binding til celleveggen gjennom aminosyren treonin (Kleerebezem et al. 2010; Mazmanian et al. 1999; Michon et al. 2016).

### **1.5.4. Ikke-kovalent binding av proteiner til celleveggen**

Overflatelokalisererte proteiner kan også festes ved ikke-kovalente interaksjoner til ulike komponenter i celleveggen. Slike proteiner kan inneholde forskjellige domenebindende motiver, blant annet LysM («Lysin motif») domener (Figur 1.4.), SLP domener («surface layer proteins»), og kolin-bindende domener (Desvaux et al. 2006). LysM domener er

utbredte, og kan finnes i flere kopier innen et protein. Proteiner bundet gjennom et LysM domene er ofte involvert i celleveggmetabolismen (Buist et al. 2008).

### **1.6. Det slimhinneassosierte immunforsvaret hos mennesker og vaksiner**

Den totale slimhinneoverflaten hos mennesker er stor, og representerer en viktig inngangsport for patogene mikroorganismer. Slimhinner dekker blant annet overflatene i den urogenitale trakten, mage-tarmkanalen og luftveiene, samt øyet, det indre øret og kanalene i alle eksokrine kjertler. Slimhinnene (mukosa), som består av epitelceller dekket med et sekret, utgjør en mekanisk og kjemisk barriere (antimikrobielle forbindelser) mot inntrengere (Holmgren & Czerkinsky 2005; Lea 2006). Slimhinnene inneholder også immunceller fra både det medfødte og det adaptive immunsystemet, og sammen representerer de et høyt spesialisert, slimhinneassosiert immunforsvar. Disse immuncellene danner forsamlinger som kalles mukosa-assosiert lymfoid vev («mucosa-associated lymphoid tissue», MALT) (Holmgren & Czerkinsky 2005; Lea 2006). Ettersom slimhinnene representerer den viktigste inngangsporten for patogener, vil det være en fordel å kunne levere vaksiner til selve infeksjonsstedet, fordi det kan gi en beskyttende effekt på selve infeksjonsstedet. Slike slimhinnevaksiner bør evne å gi både en humoral og cellemediert beskyttelse lokalt og systemisk. Slimhinnevaksiner representerer også ulike ruter for administrering, både oral-, nasal-, vaginal-, rektal- og såkalt sublingual administrering (når vaksinen plasseres under tungen for å bli absorbert av kroppen) (Czerkinsky & Holmgren 2010; Holmgren et al. 2003; Holmgren & Czerkinsky 2005).

I tillegg til fordelen med å indusere beskyttende effekt på selve infeksjonsstedet, er det også flere aspekter som favoriserer slimhinnevaksiner sammenliknet med injeksjonsvaksiner. De er antageligvis lettere å produsere, lagre og administrere, enn for eksempel sprøytebasert administrasjon. Det betyr mindre risiko for smitte av andre sykdommer (noe som er assosiert med injeksjoner), mindre behov for helsepersonell og større tilgjengelighet i utviklingsland (Holmgren et al. 2003).

Levering av vaksiner direkte til det slimhinneassosierte immunforsvaret støter imidlertid på ulike problemer for å få en vaksineeffekt. Slimhinneoverflatene utsetter vaksineantigener for ulike utfordringer, inkludert protease- og nukleaseangrep, begravning av antigenet i slimsekretet (mucus), eller at antigenet blir utvannet av mucus (Neutra & Kozlowski 2006).

Det er derfor en etablert visshet om at vaksineantigenene må leveres i kombinasjon med en adjuvans som sikrer opptak av antigenet og forsterker den påfølgende immunresponsen. Ulike fremgangsmåter for å imøtekomme disse utfordringene eksisterer, da ofte med fokus på leveringssystemer som har en iboende adjuvanseffekt. Eksempler er ulike typer lipidbaserte strukturer, nanopartikler som kitosan, levende eller svekkede bakterier, men også kommensale bakterier (se sammenfatningene av van der Lubben et al. (2001), des Rieux et al. (2006), Eriksson og Holmgren (2002) og Lian og Ho (2001)).

De forskjellige administreringsrutene viser også ulike utfordringer. Ved oral immunisering via mage-tarmkanalen møter antigenene et særdeles fiendtlig miljø ved passasjen av magesyren, samt faren for utviklingen av oral toleranse mot antigenet. For behandling av autoimmune sykdommer kan utviklingen av oral toleranse i teorien utnyttes. Terapeutiske molekyler kan leveres til slimhinnene i mage-tarmkanalen der formålet er å etterlikne den naturlige induksjonen av oral toleranse. Slike terapeutiske behandlinger mot autoimmune sykdommer har imidlertid ikke vist signifikant effekt foreløpig (Choy et al. 2001; Holmgren et al. 2003).

Stadiet i menstruasjonssyklusen har vist seg å være av betydning for utvikling av immunrespons hos noen antigener ved vaginal immunisering (Kozlowski et al. 2002). Johansson et al. (1998) demonstrerte en sterk antistoffrespons i kjønnsorganene hos hunnmus etter slimhinneimmunisering med en rekombinant B-enhet av kolera-toksinet (rCTB). Responsen, avdekket med spesifikke immunoglobulin (Ig) A og IgG-antistoffproduserende celler i vaginale slimhinner, ble påvist ved både den intranasale og vaginale administrasjonsruten, men ikke ved oral immunisering. Flere andre studier har også vist at intranasal immunisering har gitt IgA- og IgG-respons i vaginale slimhinner, og resultatene er sammenliknbare med immunresponsen som oppstår ved vaginal immunisering (Johansson et al. 2001; Kozlowski et al. 2002). Sublingual («under tungen») administrering av vaksiner har vist å indusere en bred immunrespons både i slimhinnene og systemisk (Çuburu et al. 2007). I tillegg har denne immuniseringsstrategien også demonstrert induisering av spesifikke antistoffer og cytotoxiske T-celler i kjønnsorganene til hunnmus etter vaksiner med en HIV-subenhetvaksine (Hervouet et al. 2010). Intranasal- eller sublingual immunisering kan derfor være aktuelle administreringsruter for vaksiner mot diverse kjønnsykdommer.

### 1.6.1. Viktige celler for aktivering av immunrespons

For at immunsystemet skal aktiveres, er det først og fremst nødvendig med opptak av antigener. Profesjonelle antigenpresenterende celler, inkludert makrofager, B-lymfocytter og dendrittiske celler, har spesielle roller knyttet til stimuleringen av immunforsvaret. Blant de antigenpresenterende cellene er det de dendrittiske cellene som i størst grad stimulerer det adaptive immunforsvaret og påfølgende immunologisk hukommelse (Guermontprez et al. 2002; Lea 2006). Dendrittiske celler finnes i ulike varianter i blod, lymfoide organer og i slimhinnene. De tar opp antigener fra omgivelsene ved makropinocytose (direkte opptak fra den ekstracellulære væsken) eller ved binding til overflateresptorer og påfølgende endocytose. Ulike proteolytiske enzymer vil bryte ned antigenene til peptider, før de presenteres for T-hjelperlymfocytter ( $T_H$ -celler) via hovedvevsforlikelighetsantigener klasse II («Major Histocompatibility Complex class II», MHC II) (Lea 2006). Under antigenopptaket vil de dendrittiske cellene gå inn i en modningsprosess. I denne prosessen utskiller de forskjellige cytokiner, samt at de uttrykker ulike kostimulerende molekyler på overflaten. Noen av disse molekylerne er nødvendige for presentasjon av antigen-MHC klasse II-komplekset til T-hjelperlymfocytter (Guermontprez et al. 2002). Videre utvikler  $T_H$ -celler seg til  $T_H1$ -celler eller  $T_H2$ -celler basert på produksjonsmønsteret av cytokiner.  $T_H1$ -cellene stimulerer videre den cellulære og inflammatoriske immunresponsen, mens  $T_H2$ -cellene hjelper det humorale og antistoffmedierte immunforsvaret (Lea 2006).

Som nevnt bør slimhinnevaksiner kunne indusere en humoral og cellemediert immunrespons, både lokalt og systemisk. Immunresponsen varierer imidlertid basert på hvilket antigen og hvilken antigenpresenterende celle som er involvert, og hvordan mikromiljøet er (Holmgren & Czerkinsky 2005). Ikke-patogene antigener fremmer vanligvis utviklingen av  $T_H2$ -celler, som til slutt normalt resulterer i oral toleranse. Patogener drar vanligvis immunresponsen i den andre retningen, den cellulære og inflammatoriske responsen, som generelt fremmer en bredere og sterkere immunrespons der både det humorale og cellemedierte forsvaret trigges (Holmgren & Czerkinsky 2005). De siste årene har fokuset økt med tanke på å rette slimhinnevaksinene mot dendrittiske celler for forsterket og målrettet immunrespons (Foged et al. 2002). Flere eksperimenter har vist lovende resultater innen forsøk der antigener og adjuvanser rettes mot dendrittiske celler (Mohamadzadeh et al. 2009; Trumpfheller et al. 2012). Mohamadzadeh et al. (2005) demonstrerte at artene *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jognsinii* og *Lactobacillus reuteri* aktiverte dendrittiske celler til å regulere

immunresponsen i retning av T<sub>H</sub>1-celler. Resultatene indikerer at spesifikke stammer kan fungere som en adjuvans ved vaksinerings.

### **1.7. Bakterier som levende leveringsvektorer av antigener**

Løselige antigener har dårlig immunologisk effekt når de leveres alene til det slimhinneassosierte immunforsvaret. Som nevnt (seksjon 1.6.) utsettes antigenene for ulike utfordringer der antigenet ødelegges eller «forsvinner» i slim-sekretet (Neutra & Kozlowski 2006). Leveringsvektorer benyttes for å beskytte antigenene, og ideelt sett utviser de i tillegg en adjuvanseffekt som promoterer opptaket, og forsterker effekten, av antigenet i immunforsvarets antigenpresenterende celler. Bruk av bakterier som leveringsvektorer representerer en av de mer vellykkede strategiene (Medina & Guzmán 2001). Rekombinante bakterier som leveringsvektorer av antigener er ikke foreløpig på markedet, men forskningen beveger seg mer og mer i retning av kliniske forsøk på mennesker (Daniel et al. 2011).

Levende, men svekkede, patogene bakterier har vist seg å være effektive for induisering av immunrespons i det slimhinneassosierte forsvaret (Medina & Guzmán 2000). Fordelen med svekkede, patogene bakterier er at de etterlikner den naturlige infeksjonen. Den koloniserende egenskapen til slike levende vaksinevektorer gjør at antigenene forblir tilgjengelige over tid, slik at sjansen for stimulering av immunforsvaret potensielt økes. Det finnes relativt få vaksiner som er basert på levende, svekkede, patogene bakterier. Dette på bakgrunn av den vanskelige middeelveien der bakteriene må være såpass svekket at de er trygge for mennesker, samtidig som immunogenisiteten bevares. Muligheten for at svekkede bakterier kan gjenvinne patogenisiteten sin er til stede, og de anses derfor ikke som fullstendig trygge for mennesker, spesielt hos barn og immunsupprimerte mennesker (Bermúdez-Humarán et al. 2011; Medina & Guzmán 2001). Bacillus Calmette Guerin (BCG)-vaksinen er en av de mest brukte vaksinene som er basert på svekkede bakterier (Medina & Guzmán 2001). BCG-vaksinen beskytter nyfødte barn mot tuberkulose, men ikke voksne. Det er i tillegg dokumentert alvorlige bivirkninger av vaksinen hos HIV-infiserte barn. Det er en etablert visshet for nødvendigheten av en ny vaksine for beskyttelse mot tuberkulose (Kaufmann et al. 2010).

Som et alternativ til svekkede, patogene bakterier, har det de siste par tiårene vært omfattende forskning på bruk av melkesyrebakterier som levende leveringsvektorer av slimhinnevaksiner. Mange melkesyrebakterier anerkjennes som trygge og har mottatt GRAS-status. At de i

tillegg utviser toleranse mot lav pH, og at noen arter kan besitte adjuvanseffekter, gjør melkesyrebakterier til lovende kandidater som levende leveringsvektorer av vaksiner (Mohamadzadeh et al. 2005; Su et al. 2014; Wang et al. 2016; Wyszynska et al. 2015). Melkesyrebakterier, hovedsakelig *Lactococcus* og *Lactobacillus*, har blitt anvendt til konstruksjon av rekombinante stammer. Disse genmanipuleres til å produsere heterologe proteiner som kan leveres på slimhinnene (Daniel et al. 2011). Rekombinante *Lactococcus* og *Lactobacillus* har gjennom flere studier vist å indukere beskyttelse mot ulike patogener, der heterologe proteiner fra både bakterier og virus ble benyttet til slimhinnevaksinering (se sammenfatning av Wells og Mercenier (2008)). Stammer av *Lactobacillus* ansees som spesielt potente som levende leveringsvektorer, da arten *L. plantarum* har blitt påvist i mage-tarmkanalen i opp til en uke etter administrasjon (De Vries et al. 2006; Vesa et al. 2000).

Heterologe proteiner produsert av melkesyrebakterier kan ende opp med ulike lokaliseringer; i cytoplasma, sekretert til omgivelsene, eller festet til celleoverflaten via cellemembranen eller celleveggen. De ulike ankringsmekanismene er beskrevet i seksjon 1.5. og Figur 1.4. Ikke-kovalente interaksjoner mellom proteiner og komponenter i celleveggen, som LysM domener, representerer en mulighet for å bruke levende, ikke-genmodifiserte bakterier som leveringsvektor. Strategien bygger på produksjon av et rekombinant fusjonsprotein hvor LysM domenet er translasjonelt koblet til antigenet. Dette kan produseres i en produksjonsstamme, for eksempel *Escherichia coli*. Proteinet kan deretter renses og hybridproteinet kan blandes med en melkesyrebakterie. Det vil da feste seg på overflaten til mottakerbakterien via LysM domenet (Bosma et al. 2006; Michon et al. 2016).

Problemer knyttet til bruk av rekombinante melkesyrebakterier gjelder blant annet strenge regler vedrørende genmodifiserte organismer. Et innesluttet system for å hindre spredning av rekombinante bakterier til miljøet er derfor nødvendig for potensielle vaksinekandidater med levende leveringsvektorer. Denne problemstillingen favoriserer bruk av rekombinante *Lactococcus lactis* (i motsetning til *L. plantarum*), da disse kun overlever et par timer i mage-tarmkanalen slik at formering i miljøet utelukkes (Vesa et al. 2000). Utbygging av essensielle gener som bakterien er avhengig av for overlevelse i miljøet, med gener for terapeutiske formål, har også vært en strategi for å imøtekomme reglene for miljømessig avgrensning av genmodifiserte organismer. Braat et al. (2006) modifiserte *Lactococcus lactis* til å produsere humant interleukin-10 (IL-10). Genet for tymidylatsyntase ble erstattet med genet for IL-10, og de genmodifiserte bakteriene ble gitt som behandling til pasienter med Crohns sykdom.



Bakteriene var dermed avhengig av tymidin fra miljøet for vekst og for produksjon av IL-10. Dette studiet demonstrerer en strategi som begrenser genmodifiserte bakterier til verten selv.

Som nevnt finnes det foreløpig ikke noen vaksiner på markedet som representerer bruk av rekombinante bakterier som leveringsvektor av antigener eller immunmodulerende proteiner, men forskningsfeltet har beveget seg i retning av flere kliniske forsøk på mennesker (Daniel et al. 2011). Studiet nevnt ovenfor representerer et eksempel der rekombinante bakterier har blitt benyttet i kliniske forsøk på mennesker. Et annet eksempel er studiet utført av Kawana et al. (2014) som benyttet genmodifiserte *Lactobacillus casei* som leveringsvektor for humant papillomavirus 16 (HPV16) E7 protein til pasienter med HPV16-assosiert «cervical intraepitelial neoplasi» grad 3 (CIN3). CIN3 representerer den alvorligste graden av forstadiet til livmorhalskreft. Det ble vist at oral administrasjon av *L. casei* som produserte E7-proteinet kunne gi en spesifikk slimhinneassosiert immunrespons mot E7. Hos flere pasienter ble CIN3 nedregulert til CIN2 (celleforandringer med mindre alvorlighetsgrad) etter 9 uker med behandling. Bruk av rekombinante melkesyrebakterier som leveringsvektorer av antigener og/eller immunmodulerende proteiner viser på bakgrunn av den nyeste utviklingen i forskningsfeltet (kliniske forsøk) et stort potensiale for fremtiden.

### **1.8. Den seksuelt overførbare sykdommen klamydia**

*Chlamydia trachomatis* er en gram-negativ bakterie som forårsaker den seksuelt overførbare sykdommen klamydia. Sykdommen kan hvis den oppdages behandles med antibiotika, men i 50-80 % av tilfellene er tilstanden symptomfri (Malhotra et al. 2013). Ubehandlet infeksjon kan gi bekkenbetennelse som igjen kan medføre infertilitet. Klamydia kan dermed føre til alvorlige reproduksjonskomplikasjoner (Hafner & Pelzer 2011). Klamydia er en av de mest utbredte seksuelt overførbare sykdommene, og i et samfunnsøkonomisk perspektiv knyttes store kostnader til blant annet screening og behandling, samt indirekte kostnader knyttet til infertilitetsproblemer (Hafner et al. 2014; Murray et al. 2013). Forebygging mot klamydia (og andre seksuelt overførbare sykdommer) baserer seg foreløpig på metoder som ikke stekker til; informasjon og kampanjer relatert til betydningen av (1) bruk av kondomer, (2) testing etter ubeskyttet samleie, (3) behandling ved påvist infeksjon, og (4) varsling til tidligere partnere ved infeksjon (Folkehelseinstituttet 2016; Gottlieb et al. 2014). En vaksine mot klamydia vil representere det beste tiltaket for en nedgang i antallet klamydiainfeksjoner på verdensbasis (Gottlieb et al. 2014; Hafner et al. 2014).

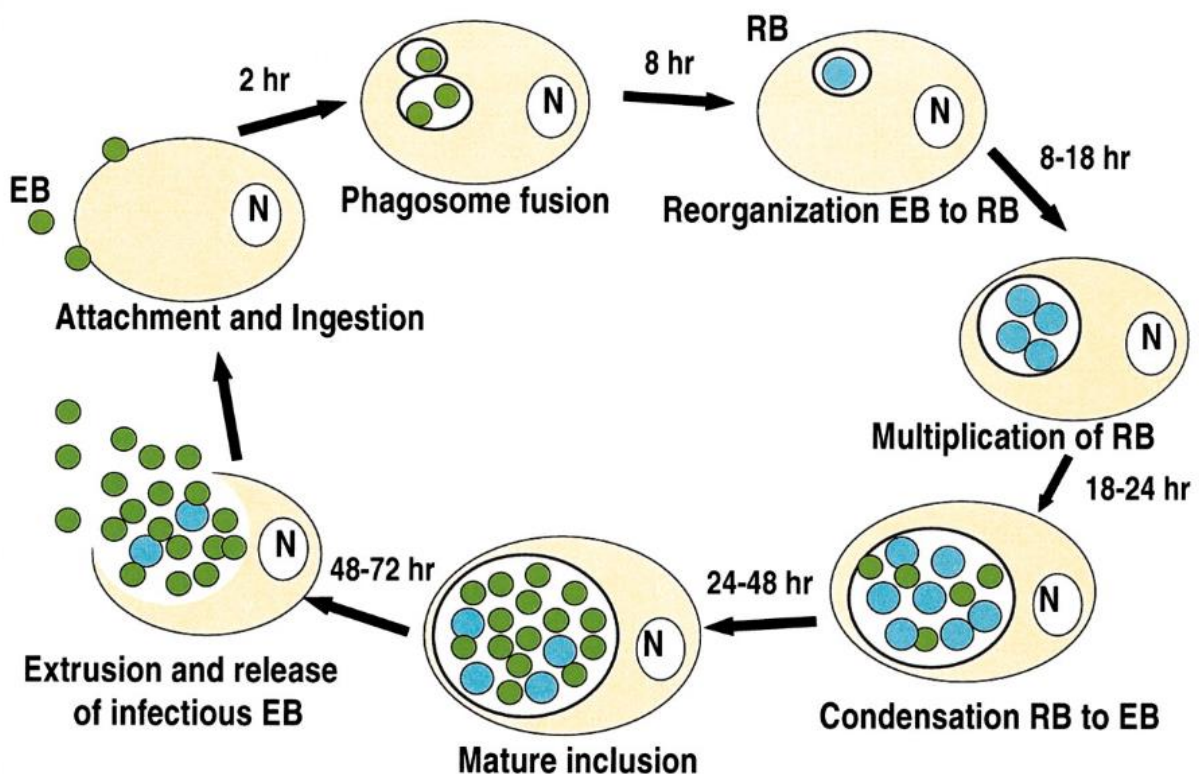
I tillegg til å infisere kjønnsorganene, kan *C. trachomatis* også forårsake øyesykdommen trakom. Trakom er en alvorlig øyesykdom og på verdensbasis er det den mest utbredte infeksjøs årsaken til blindhet. Sykdommen er mest utbredt i utviklingsland hvor dårlige hygieneforhold er rådende (World Health Organization 2016) Organization (2016) Organization (2016) Organization (2016) Organization (2016) Organization (2016) Organization (2016). Der spres bakterien ved direkte kontakt eller via fluer som har vært i kontakt med infeksjøs sekret fra øyene eller nesen (Emerson et al. 2000; Gambhir et al. 2007).

### **1.8.1. *Chlamydia trachomatis* og dens livssyklus**

*C. trachomatis* er en gram-negativ bakterie og lever som en obligat intracellulær parasitt. Den deles inn i tre biotyper som videre består av ulike serotyper (ulike typer mikroorganismer av samme art): trakoma biotypen som består av serotypene A-C, den genitale biotypen som består av serotypene D-K, og lymfogranuloma venerum (LGV) biotypen med serotypene L1-L3. Trakoma biotypen forårsaker øyesykdom, mens de to sistnevnte henholdsvis gir infeksjon i kjønnsorganene og en invasiv infeksjon i kjønnsorganene og rektum (Elwell et al. 2016).

*C. trachomatis* har en kompleks livssyklus som hovedsakelig består av elementære og retikulære legemer («elementary bodies», EB og «reticulate bodies», RB) (Fig. 1.5). EB representerer det ekstracellulære og infeksjøs stadiet av syklusen, mens RB finnes i den intracellulære og ikke-infeksjøs delen av syklusen. Livssyklusen starter ved at infeksjøs EB binder seg til overflaten av vertscellen (epitelceller på slimhinneoverflater (Rasmussen et al. 1997)) og internaliseres ved fagocytose (Fig 1.5). Etter noen timer vil bakterien gå fra EB-formen til RB. For at bakterien skal overleve må den unngå at inklusjonen smelter sammen med lysosomer. Derfor iverksettes spesifikke interaksjoner med vertscellen, og dette gjøres via inklusjonsmembranen. Det er foreslått at inklusjonsmembranen endrer sin sammensetning av proteiner for å respondere på endringer i cellen, blant annet for at vertscellen ikke skal utsettes for stress som kan føre til at inklusjonen blir angrepet av immunsystemet (Moore & Ouellette 2014). I neste trinn uttrykkes midt-syklus-genene hos bakterien, og det produseres effektormolekyler som sørger for anskaffelse av næring og opprettholder levedyktigheten til vertscellen. RB deler seg ved vanlig celledeling og inklusjonen utvider seg (Elwell et al. 2016).

Senere stadier i syklusen involverer overgangen fra RB til EB igjen, der ulike mekanismer settes i gang for å klargjøre EB til en ny runde av syklusen og en ny vertscelle infiseres. Hvis bakterien utsettes for stress, som for eksempel mangel på næringsstoffer, eksponering for vertens cytokiner eller antibiotika, kan RB innta en dvaletilstand. Det vil si at bakterien ikke deler seg, og går inn i et stadium der bakterien kalles «aberrant bodies» (AB). AB er et reversibelt stadium, hvilket betyr at fjerning av stressmomentet kan forårsake AB til å innta tilstanden som RB igjen, og dermed kan livssyklusen gjeninntas slik at nye vertsceller kan infiseres (Elwell et al. 2016).



**Figur 1.5.** Skjematisk illustrasjon av livssyklusen til *C. trachomatis*. EB fester seg til overflateresptorer på vertscellen og blir internalisert ved fagocytose. EB starter å differensiere seg til RB i en fagosomvesikkel, og RB gjennomgår massiv multiplikasjon før redifferensieringen til EB. Infeksiøse EB forlater til slutt vertscellen for å infisere andre celler der syklusen gjentas. Figuren er hentet fra Hammerschlag (2004).

### 1.9. *Chlamydia trachomatis* antigener benyttet i dette studiet

Proteinet «Major Outer Membrane Protein», MOMP, fra *C. trachomatis* har blitt viet mye oppmerksomhet som vaksine kandidat, da dette proteinet har vist seg å være immunogent i både mennesker og dyr og har muligheten til å fremprovosere en antistoff- og T-celle respons

(Farris & Morrison 2011; Pal et al. 2005). MOMP inneholder 4 variable domener og serotypene er basert på disse sekvensene (Brunham & Rey-Ladino 2005). Mange studier har undersøkt immuniseringseffekten av MOMP-baserte antigener. De fleste MOMP-baserte vaksiner har induert en eller annen form for immunrespons, men av veldig varierende grad (se oppsummering i Farris og Morrison (2011)). For å nevne noen studier, viste Pal et al. (2005) at MOMP var like effektivt som levende *C. trachomatis* til å induere en immunrespons hos mus mot genital klamydiainfeksjon. MOMP ble da administrert intramuskulært og subkutant med adjuvanser som hovedsakelig inducerer en T<sub>H</sub>1-immunrespons. Hansen et al. (2008) demonstrerte viktigheten av type adjuvans for at MOMP skulle induere en god immunrespons hos mus. I dette forsøket ble en musemodell av genital klamydiainfeksjon med arten *Chlamydia muridarum* benyttet. De testet to ulike adjuvanser; en kationisk liposomformulering («cationic adjuvant formulation 1», CAF01), som er vist å induere en T<sub>H</sub>1-respons (Davidsen et al. 2005), og aluminiumhydroksid (alum). Den alum-baserte MOMP-vaksinen gav hovedsakelig en T<sub>H</sub>2-respons og gav ikke beskyttelse mot vaginal infeksjon av *C. muridarum*. MOMP/CAF01 drev derimot immunresponsen i retning T<sub>H</sub>1-celler, og viste beskyttelse mot infeksjon av *C. muridarum* sammenliknet med kontrollgruppen.

Antigenene benyttet i dette studiet, kalt; «Heterologous immunorepeat 1» (Hirep1) og «Heterologous immunorepeat 2» (Hirep2) (Olsen et al. 2015) er basert på variabelt domene 4 (VD4) i MOMP. Olsen et al. (2015) konstruerte fusjonsproteinene Hirep1 og -2 basert på at den sentrale delen av VD4 inneholdt en konservert artsspesifikk epitop; LNPTIAG (Baehr et al. 1988; Stephens et al. 1988) (Fig 1.6.A.). Denne epitopen kan dermed gi en kryssimmunitet som kan beskytte mot flere serotyper av *C. trachomatis* (Su & Caldwell 1993). Rundt VD4 ligger blant annet membranankre som sammen med VD4-regionen representerer flere T- og B-celle epitoper (Kim & DeMars 2001; Ortiz et al. 2000). Olsen et al. (2015) lagde på bakgrunn av dette fusjonsproteiner av såkalte utvidede versjoner av VD4 («extended VD4», extVD4), der flere konservative aminosyrer som sørger for ankring til membranen ble inkludert. Hirep1 og -2 inkluderer extVD4 fra flere serotyper av *C. trachomatis* (Figur 1.6.).

A

Navn	Sekvens
extVD4 <sup>D</sup>	NMFTPYIGVKWSRSAFDSDTIRIAQPKSATAIFDITTLNPTIAGAGDVKTG AEGQLGDTMQIVSLQLN
extVD4 <sup>E</sup>	NMFTPYIGVKWSRSAFDSDTIRIAQPKSATAIFDITTLNPTIAGAGDVKAS AEGQLGDTMQIVSLQLN
extVD4 <sup>F</sup>	NMFTPYIGVKWSRSAFDSDTIRIAQRLVTPVVDITTLNPTIAG <u>S</u> GSVAGA NTEFQISDTMQIVSLQLN
extVD4 <sup>G</sup>	NMFTPYIGVKWSRASFDSENTIRIAQPKLAKPVVDITTLNPTIAG <u>S</u> GSVVAA NSEGQISDTMQIVSLQLN

B

Navn	Sammensetning av fusjonsproteiner
Hirep1	extVD4 <sup>D</sup> - extVD4 <sup>E</sup> - extVD4 <sup>F</sup>
Hirep2	extVD4 <sup>D</sup> - extVD4 <sup>E</sup> - extVD4 <sup>F</sup> - extVD4 <sup>G</sup>

**Figur 1.6. Skjematisk oversikt over VD4-baserte konstruksjoner av antigener. A)** Sekvensen til de utvidede regionene av VD4 (extVD4) fra serotypene D, E, F og G. Konservert artsspesifikk epitop er uthevet. Cystein har blitt erstattet med serin (understreket) hos serovar F og G. B) Sammensetning av fusjonsproteiner. Figuren er modifisert fra Olsen et al. (2015).

Hirep1 er en fusjon/hybrid av extVD4 fra tre serotyper (D, E og F) som vist i Figur 1.6. Hos Hirep2 er det i tillegg lagt til extVD4 fra serotype G (Figur 1.6.B).

Olsen et al. (2015) har vist at Hirep1 med en adjuvans (kationiske liposomer, CAF01), administrert både subkutant og intranasalt samtidig, gav en sterk immunrespons hos mus mot serotype-spesifikke epitoper (fra serotype D, E og F) og den konserverte artsspesifikke epitopen (Figur 1.6.A.). En beskyttende effekt ble også oppnådd ved å integrere Hirep2 (Figur 1.6.B.) i sekvensen til et rekombinant MOMP. Denne immuniseringen induserte produksjon av antistoffer mot serotype G i mus, i tillegg til de overnevnte.

### 1.10. Mål med dette studiet

Dette studiet er en del av et større prosjekt der målet er å utvikle vaksiner levert til det slimhinneassosierte immunforsvaret med levende melkesyrebakterier som leveringsvektor. Målet med dette studiet var å (1) modifisere *Lactobacillus plantarum* til å uttrykke og ankre *Chlamydia trachomatis* hybridantigener rettet mot dendrittiske celler i slimhinnene (ved hjelp av det dendrittisk celle-bindende peptidet (DC-pep), FYPSYHSTPQRP (Curiel et al. 2004),

(2) karakterisere produksjonen og ankringen av *C. trachomatis* hybridantigenene, (3) undersøke betydning av DC-pep for opptak i dendrittiske celler, og (4) undersøke hvor lenge rekombinante *L. plantarum* kunne detekteres hos mus etter intranasal og vaginal administrering.

Utgangspunktet for konstruksjon av rekombinante *L. plantarum* var pSIP-systemet som ble utviklet for induserbar produksjon av heterologe proteiner i melkesyrebakterier (Sørvig et al. 2003), og senere for å ankre måleproteiner til overflaten (Fredriksen et al. 2010; Fredriksen et al. 2012). Basert på lovende resultater av *C. trachomatis* hybridantigener som vaksinekandidater (Olsen et al. 2015), ble disse antigenene (Hirep1 og Hirep2) ankret på overflaten av *L. plantarum*. Tidligere forsøk har vist at DC-pep, fusjonert til et *Bacillus anthracis* antigen, gav en sterk beskyttende immunrespons mot infeksjon av *B. anthracis* hos mus sammenliknet med antigen uten DC-pep (Mohamadzadeh et al. 2009). På grunnlag av dette ble DC-pep fusjonert til *C. trachomatis* hybridantigene. I tillegg til å være en leveringsvektor som beskytter antigenene, er det vist at noen arter av Lactobacilli kan besitte adjuvanseffekter som kan modulere immunresponsen i ønsket retning (Mohamadzadeh et al. 2005). Det langsiktige målet med dette studiet er at rekombinante *L. plantarum* med overflateankrede *C. trachomatis* hybridantigener rettet mot dendrittiske celler kan benyttes som en vaksine mot genital klamydiainfeksjon.

Arbeidet for de nevnte målsettingene ble utført etter følgende trinn:

1. Konstruksjon av vektorer for uttrykk og ankring av Hirep1 og Hirep2 gjennom lipoprotein- og celleveggankre i *L. plantarum* WCFS1. Versjoner av disse konstruksjonene inkluderte også DC-pep.
2. Karakterisering av de rekombinante *L. plantarum* WCFS1. Karakteriseringen inkluderte analyse av bakterienes vekst og overlevelse ved ulike lagringsmetoder. Produksjon og ankring av antigenene ble analysert ved Western blot, strømningscytometri og konfokal laserskanning-mikroskopi. Kvantitativ Western blot ble også utført for estimering av mengden antigen i en gitt populasjonsstørrelse.
3. Opptaksstudie av rekombinante *L. plantarum* i dendrittiske celler for å undersøke effekten av DC-pep.
4. Forsøk med mus for å undersøke hvor lenge etter intranasal og vaginal administrering av rekombinante *L. plantarum* bakteriene kunne detekteres.

## 2. MATERIALER

### 2.1. Laboratorieutstyr

#### Laboratorieutstyr

Corex-tuber  
 Cryorør, 1,5 ml  
 Diverse glassutstyr  
 Elektroporeringskyvetter, Gene Pulser®, 0,2 cm  
 Engangskyvetter, 1,5 ml  
 Eppendorfrør, 1,5 ml og 2,0 ml  
 Falcon 2059 Polypropylene Round Bottom tube (14 ml)  
 FastPrep® tuber og lokk  
 Glasskuler  
 Macs CD14 MicroBeads (human)  
 Macs kolonner  
 Macs separator  
 Microwell plater, 96 V-formet brønner  
 Nunc-rør, 15 ml og 50 ml  
 Objektglass og dekkglass, Menzel-gläser  
 PCR-rør, 0,2 ml  
 Pipetboy comfort  
 Serologisk pipette, 5 ml, 10 ml og 25 ml  
 Sprøyter, 10-60 ml  
 Sterile filter, 0,20 µm i porestørrelse  
 Vannbad  
 Vevskulturplater, 24 brønner

#### Instrumenter

Alpha 2-4 LD Plus Freeze Dryer  
 Azure c400  
 CertoClay  
 Countess™ II Automated Cell Counter  
 Electrophoresis electricity supplier  
 FastPrep® - 24 Tissue and Cell Homogenizer  
 GelDoc EZ imager  
 Gene Pulser II  
 Inkubator/varmeskap  
 Inverted Light Microscope, Leica DM IL  
 Leica TCS SP5 Confocal laser scanning microscope  
 MacsQuant®Analyser  
 PCR-maskin  
     Mastercycler gradient  
     SimpliAmp Thermal Cycler  
 pH-meter  
 Pulse Controller Plus  
 Qubit® Fluorometer

#### Leverandør

Corning Inc.  
 Sarstedt  
  
 Bio-Rad  
 Brand  
 Axygen  
 Becton Dickinson  
 Fisher Scientific  
 Sigma  
 Miltenyi Biotec  
 Miltenyi Biotec  
 Miltenyi Biotec  
 Thermo Scientific  
 Nunc  
 Thermo Scientific  
 Axygen  
 Integra  
 Sarstedt  
 Plastipak  
 Sarstedt  
 Julaba  
 Falcon

#### Leverandør

Christ  
 Azure biosystems  
 OneMed  
 Invitrogen  
 Bio-Rad  
 MP Biomedicals  
 Bio-Rad  
 Bio-Rad  
 Termaks  
 Leica Microsystems  
 Leica Microsystems  
 Miltenyi Biotec  
  
 Eppendorf  
 Applied Biosystems  
 Metrohm  
 Bio-Rad  
 Invitrogen

Sentrifuger

Allegra X-30R Centrifuge  
Eppendorf centrifuge 5418R  
Heraeus Pico 21 centrifuge  
Heraeus Multifuge X1R  
Heraeus Megafuge 1.0  
Vacuum centrifuge  
Mikrosentrifuge MiniStar silverline  
SNAP i.d. Protein Detection System  
Steri-Cycle CO<sub>2</sub> Incubator

Ultrspec 10 Cell Density Meter

Programvare

AzureSpot Analysis Software  
CLC DNA Main Workbench 7  
MacsQuantify™ Software  
pDRAW32

Beckman Coulter  
Eppendorf  
Thermo Scientific  
Thermo Scientific  
Heraeus  
Maxi Dry Lyo, Heto  
VWR  
Millipore  
Thermo-electron  
Corporation  
Amersham  
Biosciences

Leverandør

Azure Biosystems  
Qiagen  
Miltenyi Biotec  
www.acaclone.com

## 2.2. Kjemikalier

Kjemikalier

EDTA, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
Erytromycin, C<sub>37</sub>H<sub>67</sub>NO<sub>13</sub>  
Etanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH  
Fruktose, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>  
Gentamicin, C<sub>21</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>  
Glycerol, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>  
Glycine, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>  
Hepes  
Kaliumklorid, KCl  
Kaliumdihydrogenfosfat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
Kloramfenikol, C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
Magnesiumklorid, MgCl<sub>2</sub>  
Natriumhydroksid, NaOH  
Natriumklorid, NaCl  
PeqGreen  
Polyetylen glycol, PEG<sub>1450</sub>  
SeaKem® LE Agarose  
Sukrose, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>  
Tris-base, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>  
Tween-20  
Tørrmelk pulver

Leverandør

Merck  
Merck  
Sigma-Aldrich  
VWR  
Sigma  
Merck  
Duchefa Biochemie  
Sigma  
Merck  
Merck  
Sigma  
Merck  
Sigma  
Merck  
Peqlab  
Aldrich  
Lonza  
VWR Chemicals  
Sigma  
Sigma-Aldrich  
Difco



### 2.3. Proteiner og enzymer

#### Proteiner/enzymer

#### Leverandør

##### Antistoffer

Anti-Rabbit IgG-FITC  
HRP-Goat Anti-Rabbit IgG  
Serum Rabbit-Anti-Hirep

Sigma  
Invitrogen  
Gave fra Statens  
Serum Institut (SSI)

Bovint serumalbumin (BSA)

Sigma

Føtalt bovins serum (FBS)

PAA

GM-CSF

Immunotools

Inducer peptide (SppIP)

CASLO

Interleukin 4

Immunotools

Lysozym

Sigma

MagicMark™ XP Western Protein Standard

Invitrogen

Mutanolysin

Sigma

Restriksjonsenzymer, FastDigest

Thermo Scientific

HindIII

MluI

SalI

FastDigest Green Buffer

Thermo Scientific

RED Taq DNA Polymerase Master Mix

VWR

Renset Hirep1 (0,854 mg/ml)

Gave fra SSI

Trypsin-EDTA

PAA

### 2.4. DNA

#### DNA

#### Leverandør

DNA-standarder

GeneRuler™ 1kb DNA ladder

100 bp ladder

Fermentas  
New England  
BioLabs (NEB)

### 2.5. Primere

I denne studien ble forskjellige primere benyttet til ulike formål. Primerenes navn og sekvens er presentert i Tabell 2.1., hvor sekvensene som inneholder et restriksjonssete er understreket. Formålet med de ulike primerene er forklart i Tabell 2.2.

**Tabell 2.1. Sekvenser til benyttede primere**

Oligonavn	Sekvens	Restriksjonssete
Rep3050cwaF	GGCCTCCAAGGTCGACAATATGTTTACGCCTTACA TT	SalI
Rep3050cwaR	GTTTCAGTGACACGCGTATTTAATTGTAATGACAC	MluI
H1_3050cwaF	GGCCTCCAAGGTCGACAATATGTTTACCCCGTACA	SalI
H1_3050cwaR	TTCAGTGACACGCGTGTTTAATTGTAATGAGACAA TTTGCAT	MluI
H1+2_1261F	ATTGCGGCGGTCGACAATATGTTTACTCCTTACATT GGT	SalI
H2_1261R	AATTTGAAGCTTTTAGTTCAATTGTAATGACACAA TTTG	HindIII
H1_1261R	AATTTGAAGCTTTTAGTTTAATTGTAATGAGACAA TTTGCAT	HindIII
SekF	GGCTTTTATAATATGAGATAATGCCGAC	
SekR	CCTTATGGGATTTATCTTCCTTATTCTC	
SeqRR	AGTAATTGCTTTATCAACTGCTGC	
Cwa_SeqR	TCGCTTTCGATAGAACAATC	

**Tabell 2.2. Beskrivelse av primere**

Oligonavn	Beskrivelse
Rep3050cwaF*	Fremoverprimer for amplifisering av Hirep2-sekvensen fra pUC57_DC-Hirep2
Rep3050cwaR*	Reversprimer for amplifisering av Hirep2-sekvensen fra pUC57_DC-Hirep2
H1_3050cwaF*	Fremoverprimer for amplifisering av Hirep1-sekvensen fra pUC57_DC-Hirep1
H1_3050cwaR*	Reversprimer for amplifisering av Hirep1-sekvensen fra pUC57_DC-Hirep1
H1+2_1261F*	Fremoverprimer for amplifisering av Hirep1- og Hirep2-sekvensen fra pUC57_Hirep1-DC/pUC57_Hirep2-DC
H2_1261R*	Reversprimer for amplifisering av Hirep2-sekvensen fra pUC57_Hirep2-DC
H1_1261R*	Reversprimer for amplifisering av Hirep1-sekvensen fra pUC57_Hirep1-DC
SekF	Fremoverprimer for sekvensering av alle pSIP-derivater
SekR	Reversprimer for sekvensering av alle pSIP-derivater
SeqRR	Reversprimer for sekvensering av alle pSIP-derivater
Cwa_SeqR	Reversprimer for sekvensering av alle pSIP-derivater

\* Primerene ble benyttet til konstruksjon av plasmider (Tabell 2.4.). Disse primerene inkluderte derfor et overheng bestående av baser med homologi til vektoren genene skulle bli innsatt i.

## 2.6. Bakteriestammer og plasmider

Bakteriestammer som ble benyttet er presentert i Tabell 2.3.

**Tabell 2.3. Bakteriestammer**

<b>Stammer</b>	<b>Kilde</b>
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> Gene Hogs	Invitrogen
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Kleerebezem et al. (2003)

I Tabell 2.4. er en oversikt over plasmider som har blitt benyttet eller som har blitt konstruert i denne studien.

Tabell 2.4. Plasmider

Plasmid	Beskrivelse	Kilde
pUC57_DC-Hirep2	Vektor som inneholder det syntetiske genet Hirep2 med et dendrittisk cellebindende peptid (DC-pep) N-terminalt. Genet er kodon-optimalisert for <i>L. plantarum</i>	GenScript, USA
pUC57_Hirep2-DC	Vektor som inneholder det syntetiske genet Hirep2 med DC-pep C-terminalt. Genet er kodon-optimalisert for <i>L. plantarum</i>	GenScript, USA
pUC57_DC-Hirep1	Vektor som inneholder det syntetiske genet Hirep1 med DC-pep N-terminalt. Genet er kodon-optimalisert for <i>L. plantarum</i>	GenScript, USA
pUC57_Hirep1-DC	Vektor som inneholder det syntetiske genet Hirep1 med DC-pep C-terminalt. Genet er kodon-optimalisert for <i>L. plantarum</i>	GenScript, USA
pLp_1261InvS	Et derivat av pSIP401 der signalsekvensen Lp_1261 for lipoanker er festet til deler av genet <i>inv</i> som koder for de 190 residuene C-terminalt i invasin	Fredriksen et al. (2012)
pLp_3050-DC-Ag85B-E6-cwa2	Et derivat av pSIP401 for produksjon av DC-Ag85B-E6. Lp_3050 er signalsekvens for celleveggankring	Øverland (2013)
pLp_1261-Ag85B-E6-DC	Et derivat av pSIP401 der signalsekvensen Lp_1261 for lipoanker er festet til Ag85B-E6-DC	Øverland (2013)
pEV	Et derivat av pSIP401 som mangler et målgen	Fredriksen et al. (2012)
pLp_3050-DC-Hirep2-cwa2	Et derivat av pLp_3050-DC-Ag85B-E6-cwa2 der DC-Hirep2 har erstattet DC-Ag85B-E6	Dette arbeidet
pLp_3050-Hirep2-cwa2	Et derivat av pLp_3050-DC-Hirep2-cwa2 der det N-terminale DC-pep er fjernet	Dette arbeidet
pLp_3050-DC-Hirep1-cwa2	Et derivat av pLp_3050-DC-Ag85B-E6-cwa2 der DC-Hirep1 har erstattet DC-Ag85B-E6	Dette arbeidet
pLp_3050-Hirep1-cwa2	Et derivat av pLp_3050-DC-Hirep1-cwa2 der det N-terminale DC-pep er fjernet	Dette arbeidet
pLp_1261-Hirep2-DC	Et derivat av pLp_1261InvS der Hirep2-DC har erstattet InvS	Dette arbeidet
pLp_1261-Hirep2	Et derivat av pLp_1261-Hirep2-DC der det C-terminale DC-pep er fjernet	Dette arbeidet
pLp_1261-Hirep1-DC	Et derivat av pLp_1261InvS der Hirep1-DC har erstattet InvS	Dette arbeidet
pLp_1261-Hirep1	Et derivat av pLp_1261-Hirep1-DC der det C-terminale DC-bindende peptidet er fjernet	Dette arbeidet
pValac-GFP	Et plasmid med genet «green fluorescent protein» (GFP) som ligger under kontroll av en cytomegalovirus-promotor	Guimarães et al. (2009)

## 2.7. Kits

<u>Kit</u>	<u>Leverandør</u>
GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit GenElute HP Midiprep Filter Syringes GenElute HP Midiprep Binding Columns Collection Tubes, 15 ml conical Column Preparation Solution RNase A Solution Resuspension Solution Lysis Solution Neutralization Solution Binding Solution Wash Solution 1 Wash Solution 2 Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5)	Sigma-Aldrich
iBlot® Dry Blotting System iBlot® Gel Transfer Device Blotting Roller iBlot® Gel Transfer Stack, Regular and Mini iBlot® Cathode Stack, Top iBlot® Anode Stack, Bottom iBlot® Disposable sponge iBlot® Filter paper	Invitrogen
In-Fusion® HD Cloning Kit 5× In-Fusion HD Enzyme Premix	Clontech
Novex® NuPAGE® SDS-PAGE Gel System NuPAGE® Bis-Tris Gels 10 %, 8 cm × 8 cm × 1 mm, 10 wells NuPAGE® LDS Sample Buffer (4×) NuPAGE® Reducing Agent (10×)	Invitrogen
NucleoSpin® Gel and PCR clean-up NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up columns Collection Tubes (2 ml) Binding Buffer NTI Wash Buffer NT3 Elution Buffer NE	Macherey-Nagel
PureYield™ Plasmid Miniprep System PureYield™ Minicolumns PureYield™ Collection Tubes Cell Lysis Buffer (CLC) Neutralization Solution (NSC) Endotoxin Removal Wash (ERB) Column Wash Solution (CWC) Elution Buffer (EBB)	Promega

## MATERIALER

---

Qubit® dsDNA BR Assay Kit Qubit® Assay Tubes Qubit® dsDNA BR buffer Qubit® dsDNA BR reagent Qubit® dsDNA BR standard 1 and 2	Invitrogen
Quick Ligation™ kit Quick T4 DNA Ligase 2X Quick Ligation Reaction Buffer	NEB
SNAP i.d.® Protein Detection System SNAP i.d.® Single Well Blot Holder SNAP i.d.® Spacer SNAP i.d.® Blot Roller Filterpapir	Millipore
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate Luminol/Enhancer Stable Peroxide Buffer	Thermo Scientific

### 2.8. Agar og medier

<u>Medium:</u>	<u>Leverandør:</u>
BHI (Brain-Heart-Infusion) <u>Medium:</u> 37 g BHI dH <sub>2</sub> O til 1 liter Sterilisert i en Certoclav ved 115 °C i 15 min <u>Agar:</u> BHI-medium med 1,5 % (w/v) agar Etter sterilisering ble mediet nedkjølt til omtrent 60 °C. Aktuelt antibiotikum ble tilsatt og mediet ble fordelt i petriskåler	Oxoid
MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) <u>Medium:</u> 52 g MRS dH <sub>2</sub> O til 1 liter Sterilisert i en Certoclav ved 115 °C i 15 min <u>Agar:</u> MRS-medium med 1,5 % (w/v) agar Etter sterilisering ble mediet nedkjølt til omtrent 60 °C. Aktuelt antibiotikum ble tilsatt og mediet ble fordelt i petriskåler	Oxoid
MRSSM-medium 5,2 g MRS 17,1 g sukrose (0,5 M) 2,0 g MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O (0,1 M) dH <sub>2</sub> O til 100 ml Løsningen ble sterilfiltrert (0,2 µm porestørrelse i filteret)	

RPMI Medium 1640 (1 ×) + GlutaMax™-1  
Ferdiglaget og klar til bruk fra leverandør

Gibco

S.O.C. medium  
Ferdiglaget og klar til bruk fra leverandør

Invitrogen

## 2.9. Buffere

### Buffere:

GTE (“Glucose-Tris-EDTA”)

### Innhold:

50 mM glukose  
25 mM Tris-HCl, pH 8  
10 mM EDTA, pH 8

PBS (“Phosphate Buffered Saline”), pH 7,4

8 g/l NaCl  
0,2 g/l KCl  
1,44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

TAE (“Tris-acetate/EDTA”) 50 ×

242 g Tris base  
57,1 ml eddiksyre  
100 ml 0,5 M EDTA, pH 8  
dH<sub>2</sub>O til 1 liter

TBS (“Tris Buffered Saline”), pH 7,4

150 mM NaCl  
10 mM Tris-HCl, pH 8

TGS (“Tris-Glycine-SDS”) 10 ×

Bio-Rad

TTBS

TBS  
0,1 % (v/v) Tween-20

### 3. METODE

#### 3.1. Dyrking av bakterielle kulturer

Basert på formålet for bakteriedyrkingen, ble bakteriene enten kultivert i flytende medium eller dyrket på agarplater. De konstruerte plasmidene i denne studien inneholder et gen for antibiotikaresistens. Denne egenskapen medfører at bakterier som har tatt opp plasmid selekteres ved bruk av aktuelt antibiotikum i mediet.

*Escherichia coli* ble kultivert i flytende BHI-medium ved risting og 37 °C over natt, eller dyrket frem på BHI-agar ved 37 °C over natt. *E. coli* med pUC57-plasmider ble selektert frem ved tilsetning av 100 µg/ml Ampicillin til mediet, mens *E. coli* med pSIP-derivater ble selektert ved bruk av 200 µg/ml Erytromycin i mediet.

*Lactobacillus plantarum* ble dyrket i flytende MRS eller på MRS-plater ved enten 30 °C eller 37 °C. Inkuberingstiden for flytende kulturer var over natt, mens den ble utvidet til to døgn da bakteriene ble dyrket på agarplater. Kulturene ble ikke utsatt for risting da *L. plantarum* er fakultativt anaerobe bakterier. Bakterier med pSIP-derivater ble selektert ved bruk av 5-10 µg/ml Erytromycin i mediet. *L. plantarum* med pValac-GFP-plasmidet, i tillegg til de konstruerte pSIP-derivatene, ble dyrket i nærvær av 10 µg/ml Erytromycin og 10 µg/ml Kloramfenikol.

#### 3.2. Langtidslagring av bakterier

For å lagre bakterier over tid ble bakteriekulturer tilsatt glyserol før nedfrysning ved -80 °C. Glyserol beskytter cellene under nedfrysningsprosessen. Bakterier ble dyrket over natt i aktuelt vekstmedium. Til 1 ml bakteriekultur i cryorør ble det tilsatt 300 µl sterilt 85 % (v/v) glyserol. Røret ble vendt noen ganger før det ble satt til oppbevaring ved -80 °C. Kultivering av bakteriene ble utført ved å benytte en steril tannpirker til å skrape av litt frossen kultur. Tannpirkeren ble deretter plassert i aktuelt vekstmedium med passende antibiotikum.



### 3.3. Plasmidisolering fra *E. coli*

Isolering av plasmid fra *E. coli* ble hovedsakelig utført ved bruk av kittet PureYield™ Plasmid Miniprep System. I tilfeller hvor det var nødvendig med et større DNA-utbytte, ble GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit benyttet. Metodene baserer seg på spinnkolonner der nukleinsyrer binder seg til en silicamembran.

#### Isolering ved bruk av kittet PureYield™ Plasmid Miniprep System

##### Materialer:

PureYield™ Plasmid Miniprep System, Promega (seksjon 2.7.)

##### Prosedyre:

Isoleringen av plasmid ble gjort i henhold til beskrivelsen fra leverandøren.

1. Overnattskultur (2-3 ml) ble sentrifugert ved  $16.100 \times g$  i 30 sekunder. Supernatanten ble aspirert av før bakteriepelleten ble resuspendert i 600  $\mu\text{l}$  sterilt  $\text{dH}_2\text{O}$ .
2. For å lysere cellene ble 100  $\mu\text{l}$  Cell Lysis Buffer tilsatt, og røret ble vendt flere ganger for at innholdet skulle blandes.
3. Deretter ble 350  $\mu\text{l}$  kald Neutralization Solution tilsatt, og røret ble vendt til blåfargen fra Cell Lysis Buffer forsvant.
4. Røret ble sentrifugert ved  $16.100 \times g$  i 3 minutter.
5. Omtrent 900  $\mu\text{l}$  av supernatanten ble overført til en PureYield™ Minicolumn og kolonnen ble plassert i et oppsamlingsrør.
6. Kolonnen ble sentrifugert ved  $16.100 \times g$  i 15 sekunder. Væsken i oppsamlingsrøret ble fjernet.
7. For å vaske kolonnen ble 200  $\mu\text{l}$  Endotoxin Removal Wash applisert på. Kolonnen ble sentrifugert ved  $16.100 \times g$  i 15 sekunder.
8. Neste vasketrinn ble utført ved å tilsette 400  $\mu\text{l}$  Column Wash Solution, etterfulgt av sentrifugering ved  $16.100 \times g$  i 30 sekunder.
9. Kolonnen ble plassert i et rent eppendorfrør før 50  $\mu\text{l}$  Elution Buffer ble tilsatt. Kolonnen stod til inkubering i minst 1 minutt ved romtemperatur.
10. Plasmid ble eluert ved å sentrifugere ved  $16.100 \times g$  i 15 sekunder. DNA-løsningen ble enten benyttet direkte eller satt til oppbevaring ved  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **Isolering ved bruk av kittet GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit**

#### Materialer:

GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit, Sigma-Aldrich (seksjon 2.7.)

#### Prosedyre:

Isoleringen av plasmid ble gjort i henhold til beskrivelsen fra leverandøren. Fra trinn 6 ble alle sentrifugeringene utført i en «swinging bucket rotor».

1. Overnattekultur (50 ml) ble høstet ved å sentrifugere ved  $5.000 \times g$  i 10 minutter. Supernatanten ble dekantert av.
2. Bakteriepelleten ble resuspendert i 4 ml kald Resuspension RNase A Solution.
3. Cellene ble lysert ved tilsetning av 4 ml Lysis Solution. Rett etter tilsetning ble innholdet blandet ved å vende røret forsiktig 6-8 ganger. Røret stod til inkubering ved romtemperatur i 5 minutter.
4. De lyserte cellene ble tilsatt 4 ml kald Neutralization Solution og suspensjonen ble vendt forsiktig 4-6 ganger.
5. Det nøytraliserte cellelysate ble tilsatt 3 ml Binding Solution og røret ble vendt 2 ganger. Lysatet ble deretter overført til beholderen i filtersprøyten. Lysatet stod til inkubering i sprøytebeholderen i 5 minutter slik at et hvitt aggregat (proteiner, kromosomalt DNA, osv.) fløt til toppen.
6. En GenElute HP Midiprep Binding Column ble plassert i et oppsamlingsrør og kolonnematerialet ble klargjort ved at 4 ml Column Preparation Solution ble tilsatt. Kolonnen ble sentrifugert ved  $3.000 \times g$  i 2 minutter. Væsken i oppsamlingsrøret ble fjernet.
7. Filtersprøyten ble holdt over kolonnen og et stempel ble benyttet til å presse halvparten av lysatet over i kolonnen. Kolonnen ble sentrifugert ved  $3.000 \times g$  i 2 minutter. Væsken i oppsamlingsrøret ble fjernet.
8. Trinn 7 ble gjentatt for det resterende lysatet.
9. Det ble applisert på 4 ml Wash Solution 1 og sentrifugering ved  $3.000 \times g$  i 2 minutter ble utført. Oppsamlingsrøret ble tømt for eluat.
10. Trinn 9 ble gjentatt med Wash Solution 2.
11. Kolonnen ble plassert i et nytt oppsamlingsrør, og 1 ml Elution Solution ble tilsatt. Sentrifugering ved  $3.000 \times g$  i 5 minutter ble utført for og eluere plasmid-DNA. DNA-løsningen ble enten benyttet direkte eller satt til oppbevaring ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4. Oppkonsentrering av DNA ved vakuumsentrifugering

For å oppkonsentrere løsninger med lav DNA-konsentrasjon ble 0,5 ml DNA-løsning sentrifugert i en vakuumsentrifuge ved 37 °C. Etter omtrent 2,5 timer var all væsken fordampet. Det ble tilsatt 10 µl sterilt dH<sub>2</sub>O, etterfulgt av vortexing før ny konsentrasjon ble bestemt.

### 3.5. Polymerase kjedereaksjon («Polymerase chain reaction», PCR)

En polymerase kjedereaksjon er en metode som benyttes for å amplifisere spesifikke DNA-fragmenter. Amplifiseringen krever tilstedeværelse av følgende komponenter: DNA-templat, primere, de fire deoksynukleotid trifosfat (dNTP) og en varmestabil polymerase. Reaksjonen utføres i en termosyklus som programmeres til å inneholde trinnene denaturering, hybridisering og polymerisering.

*Denaturering* foregår ved høy temperatur (95-98 °C) slik at dobbeltrådet DNA denatureres til enkelttrådet DNA. *Hybridisering* («annealing») opptrer etter nedkjøling av reaksjonsløsningen, og spesifikke primere (oligonukleotider som er komplementære til DNA-tråden over omtrent 20 baser) binder seg til enkelttrådet DNA. *Polymerisering* («elongation») av nye DNA-molekyler utspringer fra primerene ved at temperaturen settes lik optimaltemperaturen til polymerasen. Polymerasen inkorporerer dNTP fra 3'-enden av primerne. Ved å gjenta prosessene denaturering, hybridisering og polymerisering i flere syklus, vil en eksponentiell amplifisering av DNA-fragmentet forekomme.

#### PCR-reaksjon med bruk av Q5-High-Fidelity 2 × Master Mix

Prosedyren ble utført i henhold til beskrivelsen fra leverandøren av Q5-High-Fidelity 2 × Master Mix. Metoden ble benyttet til å fjerne det dendrittisk cellebindende peptidet (DC-pep) i syntetiske gen før kloning (seksjon 2.5. og 2.6.).

#### Materialer:

2 x Q5-High-Fidelity Master Mix

Primere (seksjon 2.5.)

Sterilt dH<sub>2</sub>O

DNA-templat

Prosedyre:

1. Reagensene i Tabell 3.1. ble overført til PCR-rør (0,2 ml). PCR-rør og alle løsninger ble holdt kjølig. Innholdet ble blandet ved å vende rørene noen ganger etterfulgt av sentrifugering i en mikrosentrifuge for å samle reaksjonsløsningene i bunnen av rørene.

**Tabell 3.1. Reagenser for Q5-High-Fidelity PCR**

Reagens	Volum (µl)	Konsentrasjon
Q5-High-Fidelity (2 ×)	25	1 ×
Fremoverprimer (50 µM)	1	1 µM
Reversprimer (50 µM)	1	1 µM
DNA-templat	1	Variabelt
Sterilt dH <sub>2</sub> O	22	

2. Rørene ble plassert i en termosyklus, og programmet presentert i Tabell 3.2. ble benyttet for amplifisering av DNA.

**Tabell 3.2. Innstillinger for Q5-High-Fidelity PCR**

Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Initial denaturering	98	30 sek	1
Denaturering	98	5 sek	
Hybridisering	60	10 sek	30
Polymerisering	72	20 sek	
Sluttpolymerisering	72	2 min	1
Oppbevaring	4	∞	

3. PCR-produktene ble analysert direkte ved gelelektroforese.

**PCR-reaksjon med bruk av VWR Red Taq DNA Polymerase Master Mix**

Prosedyren ble utført i henhold til beskrivelsen fra leverandøren av VWR Taq DNA Polymerase Master Mix. Metoden ble hovedsakelig benyttet ved koloni-PCR der formålet var å sjekke om bakterier inneholdt ønskelig plasmid etter transformering.

Materialer:

Taq Master Mix RED

Primere (seksjon 2.5.)

Sterilt dH<sub>2</sub>O

DNA-templat

Prosedyre:

1. En steril tannpirker ble benyttet til å plukke celler fra en koloni og overføre disse til et sterilt PCR-rør (0,2 ml).
2. PCR-rørene med bakteriene ble varmebehandlet i mikrobølgeovn i 1 min ved 850 W for at bakteriecellene skulle bli lysert.
3. Reagensene i Tabell 3.3. ble tilsatt. PCR-rør og alle løsninger ble holdt kjølig. Innholdet ble blandet ved å vende rørene noen ganger etterfulgt av sentrifugering i en mikrosentrifuge for å samle reaksjonsløsningene i bunnen av rørene.

**Tabell 3.3. Reagenser for Red Taq PCR**

Reagens	Volum (µl)	Konsentrasjon
Taq Master Mix Red (2 ×)	25	1 ×
Fremoverprimer (50 µM)	1	1 µM
Reversprimer (50 µM)	1	1 µM
DNA-templat	Variabelt	
Sterilt dH <sub>2</sub> O	Til 50	

4. Rørene ble plassert i en termosyklus og kjørt med programmet vist i Tabell 3.4.

**Tabell 3.4. Innstillinger for Red Taq PCR**

Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Initial denaturering	95	2 min	1
Denaturering	95	20 sek	
Hybridisering	52	25 sek	30
Polymerisering	72	35 sek	
Sluttpolymerisering	72	5 min	1
Oppbevaring	10	∞	

5. PCR-reaksjonen ble enten benyttet direkte i gelelektroforese (seksjon 3.6.) eller satt til oppbevaring ved -20 °C.

### 3.6. Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese benyttes for å separere DNA-fragmenter på grunnlag av deres størrelse. Separasjonen foregår ved tilføring av en elektrisk spenning slik at negativt ladede DNA-molekyler vil vandre mot anoden. Agarosegelen består av et nettverk av porer, noe som medfører at de minste DNA-molekylene vil vandre lengst i gelen. DNA-fragmentene som ble separert var over 200 basepar, dermed ble en 1,2 % agarosegel benyttet til separeringen i dette studiet.

#### Materialer:

SeaKem® LE Agarose

TAE-buffer

PeqGreen

Loading dye

DNA størrelsesstandard

GelDoc EZ imager

#### Prosedyre:

1. Det ble laget en 1,2 % stockløsning av agarose; 12 g agarose ble tilsatt 1 L TAE-buffer. Blandingen ble autoklavert ved 115 °C i 15 min for at agarosen skulle løse seg, og ble deretter satt til oppbevaring ved 60 °C.
2. For støping av gel ble ca. 60 ml 1,2 % stockløsning av agarose tilsatt 2,5 µl PeqGreen før agaroseløsningen ble overført til et støpekammer med kam for brønnene.
3. Etter omtrent 30 min var gelen stivnet. Kammen for brønnene ble fjernet før gelen ble overført til et elektroforesekammer og ble dekket med TAE-buffer.
4. DNA størrelsesstandard og DNA-prøver blandet med loading dye ble applisert på gelen. Gelen ble kjørt på 90 V i 30-50 min.
5. DNA-fragmentene ble visualisert og tatt bilde av i en GelDoc-maskin.

### 3.7. Ekstrahering av DNA fra agarosegel

Kittet NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up ble benyttet for å ekstrahere DNA-fragmenter fra agarosegel. Prosedyren ble utført i henhold til beskrivelsen fra leverandøren.

#### Materialer:

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel (seksjon 2.7.)

#### Prosedyre:

1. Agarosegelen ble lagt på en UV-plate, og en steril skalpell ble benyttet til å skjære ut området i gelen med ønsket DNA-fragment. Gelbiten ble overført til et eppendorfrør.
2. Per 100 mg av agarosegel ble 200 µl NTI buffer tilsatt. Deretter ble rørene satt til inkubering i vannbad ved 50 °C i 5-10 min. Rørene ble vortexet hvert 2-3 minutt, og inkuberingen ble avsluttet da gelen var oppløst.
3. Opptil 700 µl av prøvene ble applisert på en NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column. Kolonnen ble plassert i en oppsamlingsbeholder, før sentrifugering ved  $11.000 \times g$  i 30 sek.
4. Væsken i oppsamlingsbeholderen ble fjernet. Eventuell resterende prøve ble satt på samme kolonne og trinn 3 ble gjentatt.
5. For å vaske kolonnen ble 700 µl buffer NT3 tilsatt. Kolonnen ble sentrifugert ved  $11.000 \times g$  i 30 sek. Væsken i oppsamlingsbeholderen ble fjernet.
6. Trinn 5 ble gjentatt for å vaske kolonnen ytterligere en gang.
7. Kolonnen ble sentrifugert ved  $11.000 \times g$  i 1 min for å fjerne buffer NT3 fullstendig.
8. Kolonnen ble plassert i et rent eppendorfrør før 20 µl forvarmet (65 °C) buffer NE ble tilsatt. Etter inkubering ved romtemperatur i 5 min ble DNA eluert ved sentrifugering ved  $11.000 \times g$  i 1 min.
9. Eluert DNA ble midlertidig oppbevart på is før videre bruk, eller satt til oppbevaring ved -20 °C.

### **3.8. Kutting av DNA ved bruk av restriksjonsenzymmer og ligering av DNA-fragmenter**

Restriksjonsenzymmer er endonukleaser som spalter DNA-molekyler. Restriksjonsenzymmer bryter opp fosfodiesterbindinger på spesifikke steder, der hvert restriksjonsenzym gjenkjenner en spesifikk nukleotidsekvens. Noen restriksjonsenzymmer kan bryte opp DNA-molekyler slik at molekylet får en butt ende, det vil si at begge enkeltrådene i heliksen er brutt opp på samme posisjon. Andre restriksjonsenzymmer bryter sekvensen slik at det dannes et overheng på den ene enkeltråden, og det dannes en såkalt «klebrig» ende. Optimalt reaksjonsforhold varierer ofte hos de ulike enzymene, dermed må det tas hensyn til forhold som temperatur, saltkonsentrasjon og pH. Restriksjonsenzymmer finnes naturlig hos bakterier for beskyttelse mot blant annet virusinfeksjoner. Disse enzymene er nyttige verktøy i rekombinant genteknologi, da etterfølgende bruk av DNA-ligaser kan benyttes i tillaging av nye DNA-molekyler.

#### **3.8.1. Kutting av DNA ved bruk av FastDigest restriksjonsenzymmer**

Kutting av DNA ble utført ved bruk av FastDigest enzymmer. Disse enzymene har optimal aktivitet ved 37 °C i samvær med FastDigest Green Buffer, og dermed tillates bruk av flere restriksjonsenzymmer samtidig. Bruk av FastDigest Green buffer muliggjør applisering av de spaltede DNA-fragmentene direkte på en agarosegel.

#### Materialer:

DNA

FastDigest restriksjonsenzymmer (seksjon 2.3.)

FastDigest Green Buffer 10 ×

Sterilt dH<sub>2</sub>O

#### Prosedyre:

1. Reagensene representert i Tabell 3.5. ble tilsatt et eppendorfrør (1,5 ml).



**Tabell 3.5. Reagenser for FastDigest nedbrytning av DNA**

Reagens	Volum ( $\mu\text{l}$ )
DNA	15-40 $\mu\text{l}$
FastDigest Green Buffer 10 $\times$	5 $\mu\text{l}$
FastDigest restriksjonsenzym	5 $\mu\text{l}$ *
Sterilt dH <sub>2</sub> O	Til 50 $\mu\text{l}$

\*Totalt 5  $\mu\text{l}$  restriksjonsenzym (2,5  $\mu\text{l}$  av hvert restriksjonsenzym hvis det ble benyttet to)

2. Reaksjonsløsningene ble inkubert i vannbad ved 37 °C i 15-45 min.
3. Løsningene ble midlertidig oppbevart på is før videre bruk, eller satt til oppbevaring ved -20 °C.

### 3.8.2. Bestemmelse av DNA-konsentrasjon

DNA-konsentrasjonen i en løsning ble bestemt ved å benytte kittet Qubit® dsDNA BR Assay Kit.

#### Materialer:

Qubit® dsDNA BR Assay Kit, Invitrogen (seksjon 2.7.)

Qubit™ fluorometer

#### Prosedyre:

1. Det ble laget en arbeidsløsning: 1:200 fortyning av Qubit® dsDNA BR reagent i Qubit® dsDNA BR buffer.
2. For kalibrering av fluorometeret ble 10  $\mu\text{l}$  av Qubit® dsDNA BR standard 1 og 2 fortynnet i 190  $\mu\text{l}$  arbeidsløsning.
3. Av prøvene med ukjent DNA-konsentrasjon ble 1  $\mu\text{l}$  fortynnet i 199  $\mu\text{l}$  arbeidsløsning.
4. Alle rørene ble vortexet og sentrifugert i en mikrosentrifuge.
5. Fluorometeret ble først kalibrert med klargjorte standarder før DNA-konsentrasjonen i ukjente prøver ble bestemt.

### 3.8.3. Ligering av DNA-fragmenter

Quick Ligation™ Kit ble benyttet for ligering av DNA-fragmenter. Quick T4 DNA Ligase er et enzym som kan benyttes for ligering av fragmenter med butt- eller «klebrig» ende.

Enzymet katalyserer dannelsen av et fosfodiesterbånd mellom nukleotidene. For at reaksjonen

## METODE

---

skal finne sted krever enzymet energi i form av ATP og kofaktoren magnesiumklorid som er komponenter i reaksjonsbufferen.

### Materialer:

DNA-fragmenter

Quick Ligation™ Kit (seksjon 2.7.)

Sterilt dH<sub>2</sub>O

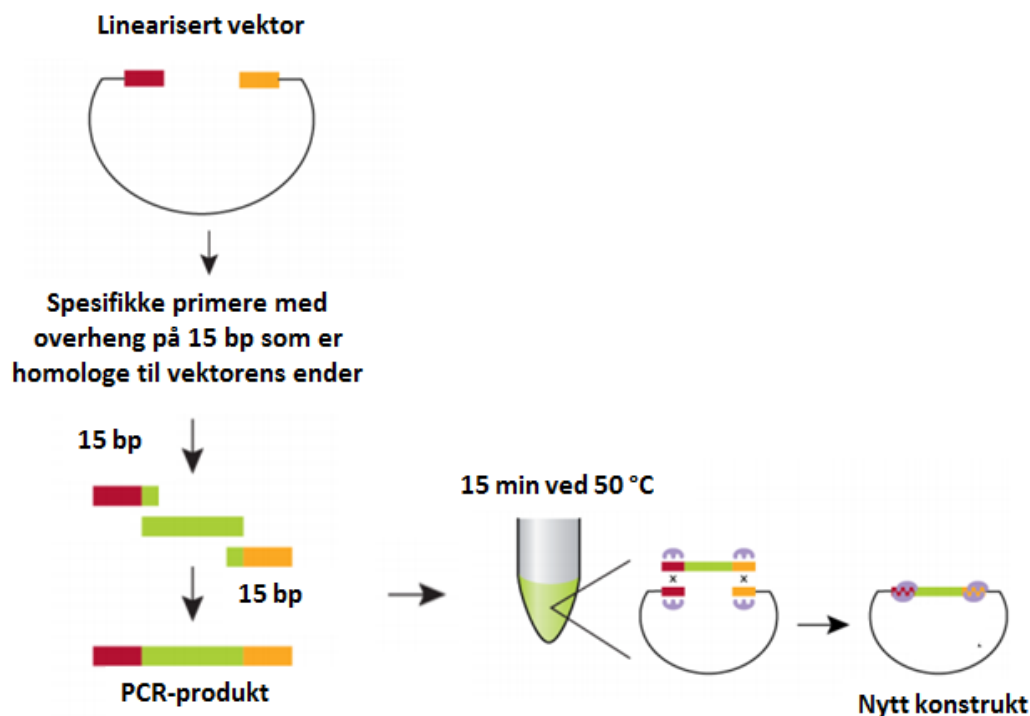
### Prosedyre:

Metoden ble utført i henhold til beskrivelsen fra leverandøren av kittet.

1. Omtrent 50 ng av vektoren og 150 ng av genet ble blandet. Det ble tilsatt sterilt dH<sub>2</sub>O til 10 µl.
2. Blandingen ble tilsatt 10 µl 2 × Quick Ligation Reaction Buffer med påfølgende vortexing.
3. Quick T4 DNA Ligase (1 µl) ble tilsatt, og reaksjonsløsningene ble vortexet før de ble spunnet i en mikrosentrifuge slik at all væske samlet seg i bunnen av røret.
4. Reaksjonene ble inkubert i vannbad ved 25 °C i 5 min, og ble deretter plassert på is i påvente av transformering (seksjon 3.9.).

### **3.8.4. In-Fusion kloning**

In-Fusion HD Cloning Kit ble benyttet for å klonere gener inn i en linearisert vektor. Enzymet i dette kittet virker ved å gjenkjenne et 15-basepars overheng på endene av det innsettende genet som er homologe til endene av vektoren. Overhengen lages ved at de settes inn på primerene som benyttes i amplifiseringen av PCR-produktet. Prosedyren er illustrert i Figur 3.1.



**Figur 3.1. Illustrasjon av prosedyre for In-Fusion kloning.** Først lages en linearisert vektor. Genspesifikke primere designes med et 15 bp-overheng som er homologe til endene på vektoren. Reaksjonsløsningen med vektor og PCR-produkt inkuberes ved 50 °C i 15 min. Deretter er et nytt konstrukt klart for transformering til kompetente *E. coli*. Illustrasjonen er modifisert fra In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual.

#### Materialer:

5 × In-Fusion HD Enzyme Premix  
 Renset PCR-produkt  
 Sterilt dH<sub>2</sub>O  
 Vektor

#### Prosedyre:

1. For å kalkulere mengden av innsettende gen (PCR-produkt) og linearisert vektor som trengtes til reaksjonen ble kalkuleringskalkulator «In-Fusion® Molar Ratio Calculator» benyttet (<http://bioinfo.clontech.com/infusion/molarRatio.do>).
2. Komponentene presentert i Tabell 3.6. ble tilsatt til to eppendorfrør.

**Tabell 3.6. Reagenser for In-fusion kloning**

Reagens	Kloningsreaksjon	Negativ kontroll
5 × In-Fusion HD	2 µl	2 µl
Enzyme Premix		
Innsettende gen	x µl	-
Linearisert vektor	x µl	x µl
Sterilt dH <sub>2</sub> O	Til 10 µl	Til 10 µl

3. Reaksjonsblandingene ble vortexet og spunnet for å samle innholdet i bunnen av røret.
4. Rørene stod til inkubering ved 50 °C i 15 min, før de ble plassert på is i påvente av transformering (seksjon 3.9.).

### 3.9. Transformering av kjemisk kompetente *Escherichia coli*

#### Materialer:

Kompetente *E. coli* TOP10/Gene Hogs

Plasmidløsning/ligeringsreaksjon

S.O.C. medium

BHI-agar med aktuelt antibiotikum

Falcon 2059 Polypropylene Round Bottom tube (14 ml)

#### Prosedyre:

1. Kjemisk kompetente *E. coli* TOP10/Gene Hogs ble tint på is før hele volumet av celler (50 µl) ble overført til en nedkjølt Falcon 2059 Polypropylene Round Bottom tube.
2. Det ble tilsatt 20 µl ligeringsreaksjon eller 5 µl plasmidløsning til cellene, og innholdet ble blandet ved å knipse forsiktig på røret. Cellene stod til inkubering på is i 30 min.
3. Cellesuspensjonen ble inkubert i et vannbad ved 42 °C i 30 sek før rørene igjen ble plassert på is.
4. Romtemperert S.O.C. medium (250 µl) ble tilsatt til cellesuspensjonen, etterfulgt av inkubering ved 37 °C og risting i minst en time.
5. Mellom 50-100 µl av transformeringsreaksjonene ble spredd på BHI-agar med aktuelt antibiotikum. Platene ble deretter satt til inkubering ved 37 °C over natt.

### 3.10. Tillaging av elektrokompetente *Lactobacillus plantarum* WCFS1

Elektrokompetente *L. plantarum* WCFS1 ble laget ved å la dem vokse i MRS-medium med glysin. Glysin erstatter L-alanin i celleveggen, noe som medfører at celleveggen blir mer permeabel for opptak av DNA fra omgivelsene. Prosedyren er basert på beskrivelsen fra Aukrust og Blom (1992).

#### Materialer:

*L. plantarum*

MRS-medium

MRS-medium med 1 % glysin

30 % PEG<sub>1450</sub>

#### Prosedyre:

1. *L. plantarum* ble dyrket over natt ved 37 °C i 10 ml MRS.
2. Det ble laget en fortynningsrekke ( $10^{-2}$ - $10^{-11}$ ) fra overnatte-kulturen, der bakteriene ble dyrket i 10 ml MRS + 1 % glysin. Fortynningsrekken ble inkubert ved 37 °C over natt.
3. Fortynningen med OD<sub>600</sub> på  $2,5 \pm 0,5$  ble dyrket videre ved å overføre 2 ml av kulturen til 40 ml MRS + 1 % glysin. Denne ferske kulturen fikk vokse ved 37 °C til OD<sub>600</sub> var  $0,7 \pm 0,07$  (logaritmisk fase i vekstkurven). Kulturen ble inkubert på is i minst 10 minutter.
4. Kulturen ble sentrifugert ved  $2.087 \times g$  ved 4 °C i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i 5 ml kald 30 % PEG<sub>1450</sub>. Cellesuspensjonen ble deretter tilsatt ytterligere 15 ml kald 30 % PEG<sub>1450</sub>. Suspensjonen ble blandet ved rolig pipettering noen ganger før inkubering på is i 10 minutter.
5. Cellene ble høstet ved sentrifugering ved  $2.087 \times g$  ved 4 °C i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet, og cellene ble resuspendert i 400 µl 30 % PEG<sub>1450</sub>.
6. Kompetente *L. plantarum* WCFS1 ble fordelt i 40 µl alikvoter i sterile eppendorfrør. Cellene ble umiddelbart fryst i flytende nitrogen og ble deretter satt til oppbevaring ved -80 °C.

### 3.11. Elektroporering av *Lactobacillus plantarum* WCFS1

Elektroporering er en metode for å transformere bakterier, der bakteriene mottar en spenningspuls som fremmer opptaket av ekstracellulært DNA.

#### Materialer:

Elektrokompetente *L. plantarum* WCFS1

MRSSM-medium

Plasmid

MRS-agar med aktuelt antibiotikum

#### Prosedyre:

1. Elektrokompetente *L. plantarum* WCFS1 ble tint på is og ble tilsatt 1-5 µl plasmid. Løsningen ble raskt overført til en nedkjølt elektroporeringskyvette, og innholdet ble forsiktig blandet uten at det ble dannet luftbobler.
2. På en elektroporator (BioRad) ble følgende parametere stilt inn:
  - Spenning 1,5 kV
  - Kapasitans 25 µF
  - Resistans 400 Ω
3. Kyvetten ble plassert i elektroporatoren og ble utsatt for en spenningspuls.
4. De transformerte cellene ble tilsatt 950 µl kald MRSSM direkte i kyvetten. Innholdet ble blandet ved resuspending før hele cellesuspensjonen ble overført til et sterilt eppendorfrør.
5. Cellene ble inkubert ved 30 °C i minst 2 timer før 50-100 µl ble spredd på petriskåler med MRS-agar og antibiotika. Skålene ble inkubert ved 37 °C i 1-2 døgn.

### 3.12. DNA-sekvensering av plasmider

Plasmidene ble sendt inn til sekvensering hos GATC biotech for verifisering av sekvensen til innsatte gen. En løsning, med 400 ng DNA, 25 pmol sekvenseringsprimer (Tabell 2.2.) og sterilt dH<sub>2</sub>O til totalt 11 µl, ble merket før innsendelse. Analyse av sekvensene ble utført ved bruk av CLC DNA Main Workbench 7 (Qiagen).

### 3.13. Analysering av genprodukter i *Lactobacillus plantarum*

For å analysere genprodukter ble ekspresjon av genene induisert med peptidet SppIP (Eijsink et al. 1996). Bakteriene ble høstet for å detektere produksjon av målproteinene ved Western blot, og for å bestemme lokalisering av målproteinene. Dette ble utført ved strømningscytometri og/eller konfokal laserskanning-mikroskopi.

#### 3.13.1. Kultivering og høsting av *L. plantarum*

##### Materialer:

MRS-medium

Erytromycin 10 mg/ml

Induseringspeptid SppIP 0,1 mg/ml

PBS-buffer

##### Prosedyre:

1. *L. plantarum* ble dyrket i MRS-medium med 10 µg/ml Erytromycin ved 37 °C over natt.
2. Kulturene ble fortynnet i 50 ml forvarmet (37 °C) MRS-medium med 10 µg/ml Erytromycin til OD<sub>600</sub> var 0,10-0,15.
3. Fortynningene ble satt til inkubering ved 37 °C til OD<sub>600</sub> var 0,28-0,33. Ved dette tidspunktet ble kulturene induisert med 25 ng/ml SppIP.
4. Induserte kulturer ble inkubert ved 37 °C i tre timer. De ble deretter satt på is for å stanse bakterieveksten.
5. Bakteriene ble høstet ved å sentrifugere kulturene ved 5.000 × g og 4 °C i 5 min.
6. Supernatanten ble dekantert av før cellepelletten ble vasket 1-3 ganger med 10 ml kald PBS. Suspensjonen ble sentrifugert ved 5.000 × g og 4 °C i 5 min.
7. Etter vaskingen ble pelleten enten resuspendert i 1 ml PBS for videre bruk, eller satt til oppbevaring ved 4 °C.

For å kunne kalkulere volumet av bakteriekultur som måtte sentrifugeres for høsting av en bestemt mengde bakterier, ble CFU/ml for hver rekombinante bakteriestamme bestemt. Det ble laget en fortynningsrekke (10<sup>-2</sup>-10<sup>-10</sup>) av bakteriekulturen i Ringers løsning. Deretter ble 100 µl av fortynningene spredd på MRS-agar med 10 µg/ml Erytromycin. Etter inkubering ved 30 °C i 2 døgn ble koloniene talt, og CFU/ml ble bestemt (Tabell V-1). Informasjonen

oppgitt i Tabell V-1 ble deretter benyttet for å kalkulere mengden bakteriekultur som måtte høstes for å sitte igjen med en bestemt mengde bakterier.

### 3.13.2. Preparering av cellelysat ved bruk av glasskuler

For å analysere om ønskede genprodukter ble produsert etter indusering med SppIP, ble det laget et cellefritt proteinekstrakt fra høstede *L. plantarum*. Bakteriecelellene ble lysert ved bruk av glasskuler.

#### Materialer:

PBS-buffer

50 mM PMSF løst i isopropanol

FastPrep-tuber

Glasskuler

#### Prosedyre:

1. Høstede bakterier (seksjon 3.13.1.) ble resuspendert i 1 ml PBS og ble tilsatt 1 mM PMSF. Suspensjonen ble overført til en FastPrep-tube med omtrent 1,5 g glasskuler.
2. FastPrep-tuben ble deretter plassert i en FastPrep® - 24 Tissue and Cell Homogenizer og ble ristet ved følgende innstillinger: 6,5 m/s i 45 sek.
3. Tuben ble sentrifugert ved  $16.100 \times g$  og  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 1 min. Supernatanten ble overført til et nytt eppendorfrør.
4. Eppendorfrøret ble også sentrifugert ved  $16.100 \times g$  og  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 1 min for å fjerne eventuelle resterende glasskuler.
5. Proteinekstraktet (supernatanten) ble overført til et nytt eppendorfrør som ble satt til oppbevaring ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.14. Gelelektroforese av proteiner

Gelelektroforese av proteiner utføres ved metoden «polyacrylamide gel electrophoresis» (PAGE) og separerer proteiner etter deres størrelser. NuPAGE® Novex Bis- Tris Electrophoresis System fra Invitrogen™ ble benyttet til dette formålet.

Proteinløsninger kokes først i en prøvebuffer med litium dodecylsulfat (LDS) og ditiotreitol (DTT) (reduserende agent). DTT bryter disulfidbroer i proteinene, mens LDS binder seg til



proteinene slik at de forblir denaturerte, samt at det gir proteinene en netto negativ ladning. Polyakrylamidgelen plasseres vertikalt i et elektroforesekammer, og ved tilkobling av spenning vil proteinene vandre mot anoden. På grunn av den netto negative ladningen vil vandringslengden kun være avhengig av proteinets størrelse, der de minste proteinene vandrer lengst. Protein størrelsen kan bestemmes ved sammenlikning med en størrelsesstandard.

#### Materialer:

NuPAGE® Novex Bis- Tris Gels

NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 ×)

NuPAGE® Reducing Agent (10 ×)

TGS-buffer

Magic Mark XP Western Protein Standard

#### Prosedyre:

1. Det ble laget en 2 × arbeidsløsning av LDS Sample Buffer (4 ×) og Reducing Agent (10 ×). Proteinløsning og arbeidsløsning ble blandet i et 1:1 forhold.
2. Prøvene ble inkubert i kokende vannbad i 10 min.
3. Gelen ble montert i elektroforesekammeret og det ble fylt på med TGS-buffer.
4. De opparbeidede prøvene og størrelsesstandard ble applisert på gelen, og den ble kjørt i 18 min på 280 V.
5. Da elektroforesen var ferdig ble gelen løsnet og plassert i dH<sub>2</sub>O før videre analyse.

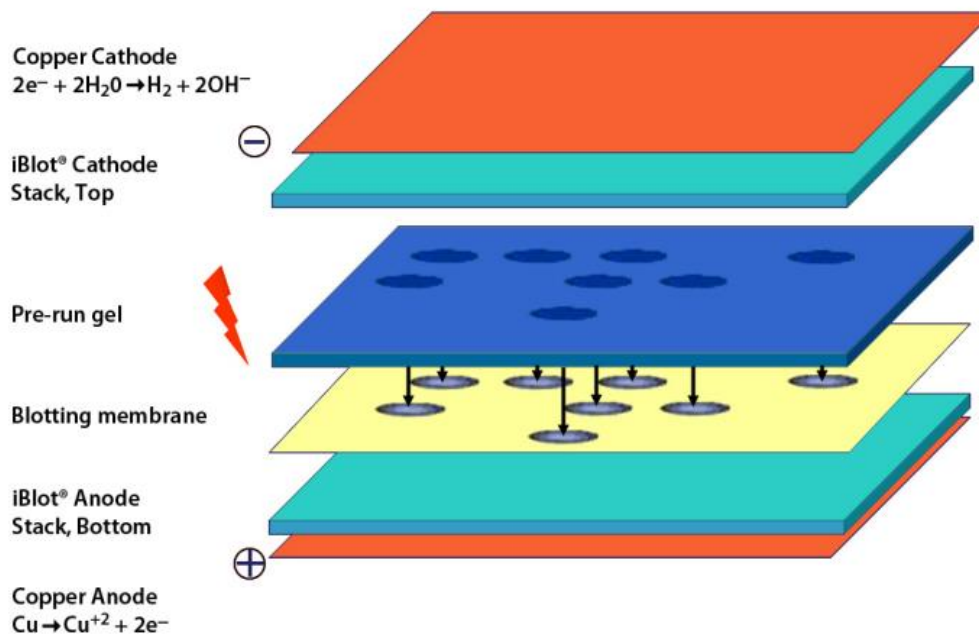
### **3.15. Western blot**

Western blot er en metode som benytter seg av antistoffhybridisering for deteksjon av proteiner. Først separeres proteinene i en løsning ved gelelektroforese (seksjon 3.14.), deretter overføres proteinene i gelen over på en membran ved en metode som kalles elektroblotting. Før selve antistoffhybridiseringen behandles membranen med en blokkeringsløsning. Blokkeringsløsningen inneholder enten bovint serumalbumin (BSA) eller tørrmelk, og formålet er at de skal blokkere for eventuelle uspesifikke interaksjoner mellom proteiner og antistoff. Videre inkuberes membranen med et primærantistoff, og dette antistoffet er produsert for å binde seg spesifikt til epitoper i det ønskede proteinet. Før inkubering med et sekundærantistoff, vaskes ubundet primærantistoff bort. Det sekundære antistoffet binder seg til det primære antistoffet. Sekundærantistoffet binder seg artsspesifikt til immunoglobuliner

og er konjugert med et enzym som virker på et substrat slik at et detekterbart signal frigjøres. I denne studien er benyttet primærantistoff produsert i kanin. Sekundærantistoffet er produsert i geit, og er rettet mot IgG hos kanin . Sekundærantistoffet er i tillegg konjugert med enzymet pepperrot peroksidase («horseradish peroxidase», HRP). HRP oksiderer luminol slik at et detekterbart lys frigjøres, og dermed vil ønskede proteiner kunne visualiseres.

### 3.15.1. Blotting med iBlot® Dry Blotting System

For å overføre proteiner fra en polyakrylamidgel til en membran, ble iBlot™ Dry Blotting System benyttet. De ulike komponentene nødvendig for utførelse av blottingen ble montert i et overføringsapparat slik som vist i Figur 3.2.



**Figur 3.2. Montering av komponentene i iBlot® Dry Blotting system.** Den nederste delen består av en kobber-anode, et lag med buffer-gel og nitrocellulosemembranen. Polyakrylamidgelen legges over nitrocellulosemembranen og dekkes med et våtet filterpapir (ikke vist i figuren), etterfulgt av den øverste delen. Den øverste delen består av et lag med buffer-gel og en kobber-katode. Figuren er hentet fra iBlot® Dry Blotting System bruksanvisning.

Materialer:

iBlot® Dry Blotting system (seksjon 2.7.)

TBS, pH 7,4

Prosedyre:

1. Polyakrylamidgelen ble vasket i dH<sub>2</sub>O i ca. 5 min.
2. Anode-delen med nitrocellulosemembranen ble plassert i overføringsapparatet. Gelen ble lagt oppå nitrocellulosemembranen.
3. Et filterpapir ble vætet i dH<sub>2</sub>O før det ble lagt over gelen. En rulle ble benyttet til å fjerne eventuelle luftbobler mellom membranen og gelen.
4. Katode-delen ble lagt over filterpapiret med kobber-elektrodesiden vendt opp. En rulle ble igjen benyttet for å fjerne eventuelle luftbobler.
5. En engangssvamp ble plassert i lokket på overføringsapparatet før apparatet ble lukket.
6. Blottingen av proteinene ble utført ved program P3 (20 V i 7 min).
7. Da blottingen var ferdig ble membranen lagt i TBS i påvente av antistoffhybridisering.

**3.15.2. SNAP i.d.® immundeteksjon**

SNAP i.d.® immundeteksjon-systemet er en tidssparende metode for antistoffhybridisering sammenliknet med tradisjonelle metoder. Dette systemet benytter seg av vakuum for å «dra» løsningene gjennom membranen.

Materialer:

SNAP i.d.® Protein detection system (seksjon 2.7.)

TTBS

TTBS/ 0,5 % BSA

Blokkeringsløsning TTBS/ 1 % BSA

Primærantistoff Serum Rabbit-Anti-Hirep

Sekundærantistoff HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)

Prosedyre:

1. Blotholderen ble åpnet og vætet med dH<sub>2</sub>O før membranen ble lagt inn i holderen med proteinsiden vendt nedover.

2. Et filterpapir ble lagt over membranen, blotholderen ble lukket og en rulle ble benyttet for å fjerne eventuelle luftbobler. Blotholderen ble lagt i en beholder i apparatet for immundeteksjon-systemet på en slik måte at proteinsiden vendte oppover.
3. Blokkeringsløsningen (30 ml) ble helt over i beholderen, og vakuemet ble satt på til all blokkeringsløsningen var forsvunnet.
4. Til 3 ml TTBS/ 0,5 % BSA ble det tilsatt 0,3 µl primærantistoff (hvis ikke annet er spesifisert). Løsningen ble vortexet før den ble tilsatt beholderen og stod til inkubering i 10 min ved romtemperatur.
5. Membranen ble vasket 3 ganger med 10 ml TTBS samtidig som vakuemet stod på. Da væsken var forsvunnet etter siste vask ble vakuemet slått av.
6. Til 3 ml TTBS/ 0,5 % BSA ble det tilsatt 0,7 µl sekundærantistoff (hvis ikke annet er spesifisert). Løsningen ble vortexet før den ble tilsatt beholderen og stod til inkubering i 10 min ved romtemperatur.
7. Trinn 5 ble gjentatt.
8. Membranen ble fjernet fra blotholderen og var klar for deteksjon av målproteiner.

### **3.15.3. Tradisjonell metode for antistoffhybridisering**

Ved tradisjonell metode for antistoffhybridisering inkuberes løsningene med membranen over lengre tid i en beholder samtidig som den står på en ristmaskin. Denne metoden ble benyttet for å teste en annen blokkeringsløsning enn den som ble benyttet ved SNAP i.d.® immundeteksjon-systemet.

#### Materialer:

TBS

TTBS

Blokkeringsløsning TTBS/ 5 % tørrmelk

TBS/ 3 % BSA

Primærantistoff Serum Rabbit-Anti-Hirep

Sekundærantistoff HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)

#### Prosedyre:

Alle trinnene foregikk ved romtemperatur bortsett fra der annet er spesifisert.

1. Membranen ble inkubert med 25 ml blokkeringsløsning i 1 time ved resting.

2. Membranen ble vasket 2 ganger med 25 ml TTBS i 10 min ved risting.
3. Membranen ble vasket en gang med 25 ml TBS i 10 min ved risting.
4. Til 15 ml TBS/ 3 % BSA ble det tilsatt 1,5 µl primærantistoff (hvis ikke annet er spesifisert). Membranen ble inkubert med løsningen ved risting og 4 °C over natt.
5. Trinn 2-3 ble gjentatt.
6. Til 15 ml blokkeringsløsning ble det tilsatt 3,5 µl sekundærantistoff (hvis ikke annet er spesifisert). Membranen ble inkubert med løsningen i 1 time ved risting.
7. Trinn 2-3 ble gjentatt.
8. Membranen var klar for deteksjon av målproteiner.

#### **3.15.4. Deteksjon av proteiner ved kjemiluminescens**

##### Materialer:

SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate

Luminol/Enhancer

Stable Peroxide Buffer

##### Prosedyre:

1. Substratløsningen ble laget ved å blande 10 ml Luminol/Enhancer og 10 ml Stable Peroxide Buffer.
2. Membranen ble inkubert med substratløsningen i 5 min samtidig som lyseeksponering ble unngått.
3. Azure c400 ble benyttet for visualisering og bildetaking av membranen.

#### **3.16. Frysetørrking av bakterier**

Bruk av *L. plantarum* som levende leveringsvektorer av antigener krever en enkel lagringsmetode for bakteriene slik at de overlever, og at det ikke skjer noen nedbryting av antigenene. Frysetørrking av induserte bakterier er en metode som muliggjør lagring av bakteriene ved romtemperatur.

##### Materialer:

PBS

Frystørkingsmedium: 11 % tørrmelk (w/v) og 12,5 g/L fruktose

### Prosedyre:

1. Rekombinante *L. plantarum* ble kultivert og induisert i henhold til beskrivelsen i seksjon 3.13.1.
2. Tre timer etter indusering ble  $1 \times 10^{10}$  bakterier høstet ved sentrifugering ved  $5.000 \times g$  og  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  i 5 min. Supernatanten ble dekantert av.
3. Cellene ble vasket med 10 ml kald PBS. Suspensjonen ble sentrifugert ved  $5.000 \times g$  og  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  i 5 min før supernatanten ble fjernet.
4. Pelletene ble resuspendert i 10 ml kaldt frysetørkingsmedium.
5. Suspensjonen ble fordelt i alikvoter på 1 ml slik at hvert rør inneholdt  $1 \times 10^9$  bakterier.
6. Cellene ble oppbevart over natt ved  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  før frysetørkingen.
7. Rørene ble plassert i Alpha 2-4 LD Plus Freeze Dryer (Christ) over natt med innstillingene: 0,040 mbar og  $-74 \text{ }^\circ\text{C}$ .
8. De frysetørkede bakteriene ble oppbevart i mørket og ved romtemperatur.
9. Hydrering av bakteriene ble utført ved å resuspendere dem i 1 ml sterilt  $\text{dH}_2\text{O}$ .
10. Levedyktigheten (CFU/ml) av *L. plantarum* etter frysetørkingsprosessen ble bestemt ved platespredning.

### **3.17. Deteksjon av overflatelokalisererte antigener**

For å detektere overflatelokalisererte antigener ble bakteriene først inkubert med et primærantistoff rettet mot det ønskede proteinet, og deretter med et sekundærantistoff konjugert til «fluorochrome fluorescein isothiocyanate» (FITC). FITC er et fluorokrom som kan eksiteres av en laserstråle og dermed emittere lys.

Strømningscytometri er en metode der celler detekteres ettersom de passerer en laserstråle en etter en. Detektorer registrerer «forward scatter» (FSC) og «side scatter» (SSC) som henholdsvis gir informasjon om cellens størrelse og cellens granularitet. Celler med overflatelokalisererte antigener vil også detekteres da FITC eksiteres av laserstrålen og fluorescenssignalet registreres. Sammen gir registrerte data informasjon om cellepopulasjonen, og relativ fluorescens i en cellepopulasjon kan sammenliknes med flere populasjoner. Deteksjon av overflatelokalisererte antigener ved bruk av konfokal laserskanning-mikroskopi følger mange av de samme prinsippene som ved strømningscytometri.

### 3.17.1. Farging av celler for strømningscytometri og konfokal laserskanning-mikroskopi

#### Materialer:

PBS

PBS/ 1 % BSA

Primærantistoff Serum Rabbit-Anti-Hirep

Sekundærantistoff Anti-Rabbit IgG-FITC (produsert i geit)

#### Prosedyre:

1. Rekombinante *L. plantarum* ble kultivert og indusert i henhold til beskrivelsen i seksjon 3.13.1.
2. Tre timer etter indusering ble cellene høstet ved sentrifugering ved  $5.000 \times g$  og  $4^\circ\text{C}$  i 5 min. Supernatanten ble aspirert av.
3. Cellene ble resuspendert i 1 ml kald PBS og suspensjonen ble sentrifugert ved  $5.000 \times g$  og  $4^\circ\text{C}$  i 5 min. Supernatanten ble fjernet før vasketrinnet ble utført en gang til.
4. Cellene ble resuspendert i 50  $\mu\text{l}$  PBS/ 1 % BSA og 0,5  $\mu\text{l}$  primærantistoff. Prøvene ble inkubert i vannbad ved  $37^\circ\text{C}$  i 30 min.
5. Suspensjonene ble sentrifugert ved  $5.000 \times g$  i 1 min for å fjerne overflødig antistoff.
6. Cellene ble deretter vasket tre ganger med 600  $\mu\text{l}$  PBS/ 1 % BSA. Etter hver vask ble prøvene sentrifugert ved  $5.000 \times g$  i 2 min. Supernatanten ble fjernet.
7. Etter siste vask ble det utført en ekstra sentrifugering ved  $5.000 \times g$  i 1 min for å fjerne all supernatant.
8. Cellene ble resuspendert i 50  $\mu\text{l}$  PBS/ 1 % BSA og 0,8  $\mu\text{l}$  sekundærantistoff. Prøvene ble inkubert i 30 min i mørket og ved romtemperatur.
9. Trinn 5-7 ble gjentatt. Vasketrinnet ble utført i fire omganger.
10. Bakteriepelletene ble rett før analyse resuspendert i 100-200  $\mu\text{l}$  PBS. Relativ fluorescens fra FITC ble analysert av MacsQuant® Analyser og MacsQuantify™ programvare.

Denne prosedyren ble også benyttet til å farge bakterier for konfokal laserskanning-mikroskopi.

### 3.18. Semi-kvantitativ Western blot

For ulike formål kan det være ønskelig å vite omtrent hvor mye protein som produseres i en gitt mengde bakterier. I dette forsøket ble semi-kvantitativ Western blot benyttet til å estimere

mengden intracellulært- og overflatelokalisert protein. AzureSpot ble benyttet til å lage en standardkurve fra proteiner med kjent konsentrasjon. Denne kurven kunne dermed benyttes til å estimere proteinkonsentrasjonen i en ukjent prøve, gitt at denne ligger innenfor området som dekkes av standardkurven. Denne analysen ble utført i samarbeid med avdelingsingeniør Lise Øverland.

### 3.18.1. Lysozymbehandling av bakterier

For å bestemme den totale intracellulære- og overflatelokaliserede mengden av målprotein, ble bakterien lysert. Bakteriene ble behandlet med lysozym og mutanolysin for å bryte ned celleveggen hos bakteriene slik at intracellulært protein ble frigjort.

#### Materialer:

PBS

GTE-buffer, pH 8

Lysozym 100 mg/ml

Mutanolysin 5000 U/ml

#### Prosedyre:

1. Rekombinante *L. plantarum* ble kultivert og indusert i henhold til beskrivelsen i seksjon 3.13.1.
2. Tre timer etter indusering ble  $1 \times 10^9$  bakterier høstet ved sentrifugering ved  $5.000 \times g$  og  $4^\circ\text{C}$  i 5 min. Supernatanten ble aspirert av.
3. Bakteriene ble vasket en gang med 1 ml kald PBS. Sentrifugeringen ble gjentatt og supernatanten ble fjernet. Rørene med bakteriepellet ble fryst ved  $-20^\circ\text{C}$ .
4. Rør med bakteriepellet ble tatt ut fra  $-20^\circ\text{C}$  og tint ved romtemperatur i omtrent 5 min. Deretter ble bakteriepelleten resuspendert i 125  $\mu\text{l}$  GTE-buffer med lysozym (10 mg/ml) og mutanolysin (15 U/ml). Suspensjonen ble inkubert i vannbad ved  $37^\circ\text{C}$  i 30 min.
5. Røret ble deretter satt direkte ved  $-80^\circ\text{C}$  i 15 min.
6. Etter frysebehandlingen ble røret satt i kokende vannbad i 15 min.
7. Proteinekstraktet ble benyttet i semi-kvantitativ Western blot (seksjon 3.18.2.).



### 3.18.2. Semi-kvantitativ Western blot

#### Materialer:

Lyserte bakterier

Renset Hirep1 (0,854 mg/ml) (gave fra Statens Serum Institut)

Sterilt dH<sub>2</sub>O

#### Prosedyre:

1. Protein ekstrakt (seksjon 3.18.1.) ble fortynnet i sterilt dH<sub>2</sub>O i forholdene 1:20, 1:30, 1:40, og 1:50.
2. Det ble laget en fortynningsrekke av rensed Hirep1-proteinløsning med konsentrasjon 0,854 mg/ml. Fortynningene hadde konsentrasjon 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1,5 µg/ml, 1 µg/ml og 0,5 µg/ml.
3. Av begge fortynningsrekkene ble 5 µl av hver fortynning blandet med 5 µl 2 × arbeidsløsning av LDS Sample Buffer (4 ×) og Reducing Agent (10 ×). Hele volumet (10 µl) ble applisert på gelen. Gelelektroforese av proteinene ble utført i henhold til beskrivelsen i seksjon 3.14.
4. Proteinene i gelen ble videre blottet over på en nitrocellulosemembran. Deretter ble membranen hybridisert med antistoff og proteiner ble detektert ved kjemiluminescens (seksjonene 3.15.1. Blotting med iBlot™ Dry Blotting system, 3.15.2. SNAP i.d.® immundeteksjon og 3.15.4. Deteksjon av proteiner ved kjemiluminescens).
5. AzureSpot ble benyttet til å kvantifisere proteinmengden. Proteinbåndene med kjent konsentrasjon (tilsvarte 20,0 ng, 10,0 ng, 7,5 ng, 5,0 ng og 2,5 ng på polyakrylamidgelen) ble markert manuelt, og programvaren lagde en standardkurve ut i fra oppgitte konsentrasjoner.
6. Bakteriepelletene ble fortynnet slik at de lå innenfor standardkurven som ble benyttet til å estimere konsentrasjonen av protein.

### 3.19. Opptak av rekombinante *L. plantarum* i dendrittiske celler

De rekombinante bakteriene laget i dette studiet inneholder *C. trachomatis* hybridantigener både med og uten et dendrittisk cellebindende peptid (DC-pep). For å undersøke effekten av DC-pep, fikk bakteriene innsatt et ekstra plasmid, pValac-GFP (Tabell 2.4.). Plasmidet inneholder et gen som koder for «green fluorescent protein» (GFP) som gjør det mulig å følge opptaket av bakteriene i dendrittiske celler. Ved å analysere cellepopulasjonene av dendrittiske

celler som har blitt inkubert med de ulike rekombinante bakteriene med strømningscytometri, vil produksjon av GFP kunne detekteres.

### 3.19.1. Isolering av monocytter med CD14-markøren

Monocytter er hvite blodceller som kan vandre ut i vevet. Monocytter som er positive for markøren CD14, kan utvikle seg til dendrittiske celler. For at dette skal skje, må de spesifikke cytokinene interleukin 4 (IL-4) og «granulocyte-macrophage colony-stimulating factor» (GM-CSF) være i nærmiljøet. CD14-positive celler kan isoleres fra perifere blodleukocytter (PBL) ved å benytte magnetiske kuler som binder seg spesifikt til CD14-markøren. De merkede cellene kan isoleres fra den resterende cellepopulasjonen ved bruk av en kolonne som holdes inntil et sterkt magnetisk felt. Da vil umerkede celler vaskes ut, mens de merkede cellene forblir i kolonnen til den fjernes fra magnetfeltet.

#### Materialer:

Macs CD14 MicroBeads (human)

Macs LS Column

Macs Pre-Separation filter (30 µm)

Macs Separator

Vaskebuffer, PBS/ 0,5 % BSA/ 2 mM EDTA

RPMI-1640/ 10 % føtalt bovins serum (FBS)/ 25 µg/ml Gentamicin

IL-4

GM-CSF

24-brønners vevskulturplate

#### Prosedyre:

1. Et rør med 50 ml RPMI-1640/ 10 % FBS/ 25 µg/ml Gentamicin ble satt på is.
2. Rør med PBL ble tint forsiktig i vannbad (37 °C) til det fryste innholdet løsnet fra rørets innside. Innholdet ble overført til det nedkjølte røret med RPMI/ 10 % FBS/ 25 µg/ml Gentamicin.
3. Cellesuspensjonen ble sentrifugert ved  $340 \times g$  i 10 min. Supernatanten ble deretter aspirert av.
4. Cellene ble resuspendert i 80 µl vaskebuffer per  $10^7$  celler. Det ble videre tilsatt 20 µl CD14 MicroBeads per  $10^7$  celler.

5. Suspensjonen ble forsiktig blandet ved å knipse på røret og røret ble satt til inkubering i kjøleskap (4 °C) i 15 min. Innholdet ble forsiktig blandet ved å knipse på røret 1-2 ganger underveis i inkuberingen.
6. Etter inkuberingen ble 10 ml vaskebuffer tilsatt, røret ble sentrifugert ved  $340 \times g$  i 10 min og supernatanten ble aspirert av.
7. En Macs LS Column ble montert til en Macs Separator og 3 ml vaskebuffer ble applisert på kolonnen for å klargjøre kolonnematerialet.
8. Cellene ble resuspendert i 3 ml vaskebuffer før de ble overført til kolonnen gjennom et Macs Pre-Separation filter.
9. Kolonnen ble vasket 3 ganger med 3 ml vaskebuffer.
10. CD14-positive celler ble eluert ved å fjerne kolonnen fra separatoren (magneten), tilsette 5 ml vaskebuffer og deretter presse cellesuspensjonen ut av kolonnen ved bruk av et stempel.
11. Cellesuspensjonen ble sentrifugert ved  $340 \times g$  i 10 min og supernatanten ble aspirert av.
12. Cellene ble resuspendert i RPMI/ 10 % FBS/ 25 µg/ml Gentamicin forvarmet til 37 °C. Det ble tilsatt 25 ng/ml IL-4 og 50 ng/ml GM-CSF.
13. Cellesuspensjonen ble fordelt i en 24-brønners vevskulturplate der det ble avsatt 0,5 ml suspensjon med 1 million celler i hver brønn. Platen ble satt til inkubering ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.
14. På dag 3 etter isoleringen ble differensieringsmediet forsiktig aspirert av før nytt, forvarmet (37 °C) RPMI/ 10 % FBS/ 25 µg/ml Gentamicin med 25 ng/ml IL-4 og 50 ng/ml GM-CSF ble tilsatt (0,5 ml i hver brønn).
15. Et Leica mikroskop ble benyttet til å bekrefte at cellene var ferdig differensiert til dendrittiske celler på dag 6. Cellene var klare for videre inkubering med rekombinante bakterier.

### **3.19.2. Ko-inkubering av bakterier og dendrittiske celler**

#### Materialer:

PBS

RPMI-1640/ 10 % FBS

RPMI-1640/ 10 % FBS/Penicillin-Streptomycin

Gentamicin 50 mg/ml

1 M Tris-HCl, pH 8,5

### Prosedyre:

Mediene benyttet i denne prosedyren var forvarmet til 37 °C.

1. *L. plantarum* med ulike plasmider ble kultivert og induert i henhold til beskrivelsen i seksjon 3.13.1.
2. Tre timer etter induering ble  $1 \times 10^9$  celler høstet ved sentrifugering ved  $5.000 \times g$  og 4 °C i 5 min. Supernatanten ble fjernet.
3. Bakteriene ble vasket tre ganger med 1 ml kald PBS. Rør med bakteriepellet ble oppbevart ved 4 °C frem til inkubering med dendrittske celler.
4. I vevskulturplaten med dendrittske celler (seksjon 3.19.1.) ble mediet aspirert av og cellene ble vasket med 0,5 ml RPMI-1640/ 10 % FBS. Vaskingen ble utført for å fjerne Gentamicin fra differensieringsmediet.
5. Rekombinante bakterier ble resuspendert i 1 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,5. De dendrittske cellene ble tilsatt 0,5 ml RPMI-1640/ 10 % FBS og 100 µl bakteriesuspensjon. Det ble dermed tilsatt 100 bakterier per dendrittske celle.
6. De dendrittske cellene ble inkubert med bakterier i 2 timer ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.
7. Etter inkuberingen ble mediet/bakteriene aspirert av. De dendrittske cellene ble vasket 3 ganger med 700 µl RPMI-1640/ 10 % FBS.
8. Videre ble de dendrittske cellene inkubert med en løsning bestående av RPMI-1640/ 10 % FBS/150 µg/ml Gentamicin i 2 timer ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> for at ikke-internaliserte bakterier skulle drepes.
9. Trinn 6 ble gjentatt, men med RPMI-1640/ 10 % FBS/Penicillin-Streptomycin.
10. Det ble tilsatt 0,5 ml RPMI-1640/ 10 % FBS/Penicillin-Streptomycin til brønnene. Platen ble satt til inkubering ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 36 timer før analysing av opptaket av rekombinante bakterier ble utført.

### **3.19.3. Analyse av opptak ved bruk av strømningscytometri**

#### Materialer:

PBS

RPMI-1640/ 10 % FBS/Penicillin-Streptomycin

Trypsin-EDTA

96-brønners plate med V-formet brønner

Prosedyre:

1. Mediet i vevskulturplaten ble forsiktig aspirert av. Cellene ble vasket med 0,25 ml forvarmet (37 °C) PBS.
2. For at cellene skulle løsne fra platen ble 0,25 ml Trypsin-EDTA tilsatt. Platen ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 10-20 min.
3. Etter inkuberingen ble 0,25 ml RPMI-1640/ 10 % FBS/Penicillin-Streptomycin tilsatt brønnene.
4. Suspensjonen i brønnene ble overført til en 96-brønners plate med V-formet brønner. Platen ble sentrifugert ved 1300 rpm i 8 min. Supernatanten ble fjernet.
5. Cellene ble rett før analyse resuspendert i 20-50 µl RPMI-1640/ 10 % FBS/Penicillin-Streptomycin. Celler som produserte GFP ble analysert av MacsQuant® Analyser og MacsQuantify™ programvare.

**3.20. Deteksjon av rekombinante bakterier i nasale- og vaginale slimhinner**

Hunnmus (B6C3F1) ble gitt vaksine i form av *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC intranasalt og intravaginalt. Formålet var å undersøke hvor lenge etter administrasjon bakteriene kunne detekteres. Eksperimentet var godkjent av det norske Forsøksdyrutvalget (Mattilsynet, Norge). Forsøket ble utført i samarbeid med Ph.D. Katarzyna Kuczkowska.

Materialer:

Hunnmus, stamme B6C3F1 (bestilt fra Envigo gjennom Folkehelseinstituttet, Norge)

Ventilerte bur (Innovive Inc, San Diego)

Standarddiett RM1 (SDS Special Diet Services, Whitham, UK)

Hormon Depo-Provera (gave fra Statens Serum Institut, København)

PBS

Isofluran-kammer

MRS med 10 µg/ml Erytromycin

Prosedyre:

1. Hunnmus ble levert fire uker gamle og ble ivaretatt under patogenfrie forhold i individuelt ventilerte bur ved standardbetingelser (sykler med 12 timer mørke

etterfulgt av 12 timer lys, 23-25 °C og 45-50 % relativ fuktighet). Vann og standarddiett RM1 ble gitt ved behov.

2. Musene mottok en subkutan injeksjon (50 µl) av hormonet Depo-Provera for å synkronisere menstruasjonssyklusen etter 13 dager med akklimatisering.
3. En uke etter hormonbehandlingen ble immunisering startet. *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC ble kultivert og høstet slik det er beskrevet i seksjon 3.13.1., og resuspendert i PBS ( $1 \times 10^9$  bakterier/20 µl PBS). Musene ble delt inn i fem grupper med fem mus i hver gruppe: kalt Gr. 1 – Negativ kontroll; Gr. 2 – Intranasal; Gr. 3 – Intranasal boost; Gr. 4 – Intravaginal; Gr. 5 – Intravaginal boost. Ingen vaksiner ble gitt til negativ kontroll, mens de resterende gruppene (Gr. 2-5) mottok en vaksinedose 7 dager etter hormonbehandlingen. Gr. 3 og Gr. 5 mottok en andre vaksinedose påfølgende dag. Intravaginal administrering ble utført ved injisering med pipette av  $1 \times 10^9$  bakterier løst i 20 µl PBS i vagina (bedøvelse av mus var ikke nødvendig). Ved intranasal administrering ble  $1 \times 10^9$  bakterier/20 µl PBS fordelt i begge neseborene med en pipette (10 µl i hvert nesebor). Musene ble i forkant av intranasal immunisering bedøvet ved bruk av isofluran som anestetikum.
4. Fra dagen etter siste vaksinedose ble det innsamlet prøver (vaginalt og nasalt) for å undersøke hvor lenge bakteriene kunne detekteres. Bakterieprøver fra vagina ble tatt annenhver dag ved bruk av inokuleringsspinner som ble sirkulert i vaginaen, for deretter å bli strøket ut på MRS-agar med 10 µg/ml Erytromycin. Nasale bakterieprøver ble anskaffet ved neseskylning med 5 µl PBS, som deretter på spredd på MRS-agar med 10 µg/ml Erytromycin. Prøvene ble tatt fra ett tilfeldig nesebor og ble tatt hver dag (musene ble i forkant bedøvd med isofluran). Det ble innsamlet både nasale- og vaginale bakterieprøver fra Gr. 1 (negativ kontroll). Petriskålene ble inkubert ved 37 °C i to døgn.
5. Eventuell vekst på MRS-platene ble registrert, og koloni-PCR (seksjon 3.5.) ble utført for å undersøke om bakteriene var i besittelse av plasmidet pLp\_1261-Hirep2-DC.

## 4. RESULTATER

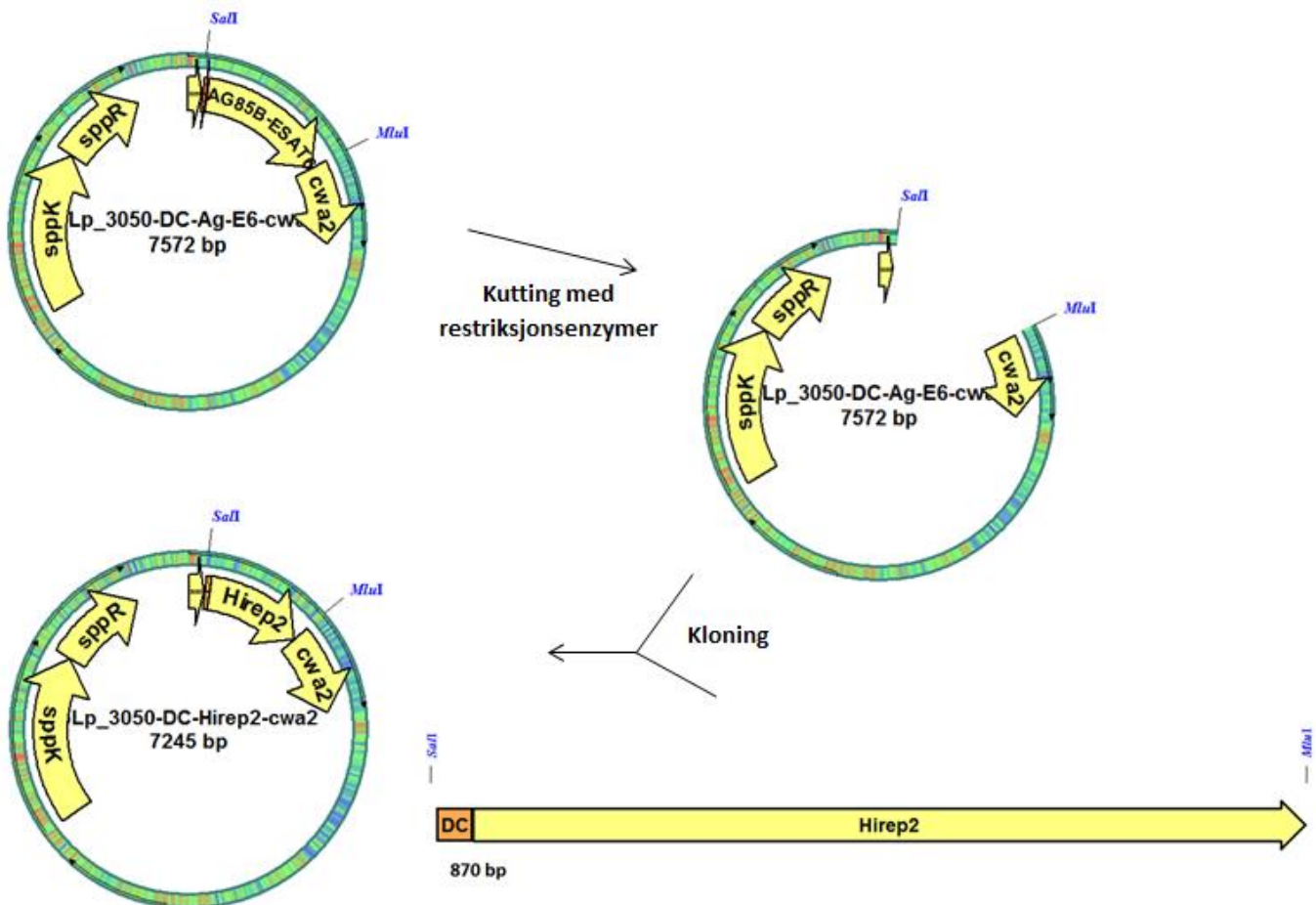
I denne oppgaven ble *Chlamydia trachomatis* hybridantigenene, «Heterologous immunorepeat 1» (Hirep1) og «Heterologous immunorepeat 2» (Hirep2) (Olsen et al. 2015), benyttet. Dette er fusjonsantigener som inneholder arts- og serotype-spesifikke epitoper fra flere serotyper (seksjon 1.9. og Figur 1.6.). Hirep1 representerer epitoper fra serotypene D, E og F (Figur 1.6.B.), mens i Hirep2 er det i tillegg lagt til en epitop fra serotype G (Figur 1.6.B.). Studier utført av Olsen et al. (2015) har vist lovende resultater for bruk av disse antigenene i beskyttelse mot genital klamydiainfeksjon. I dette studiet ble Hirep1 og Hirep2 klonet inn på plasmider for og ankres på overflaten av *Lactobacillus plantarum* (oversikt over plasmider som ble konstruert er gitt i Tabell 4.1.). Vektorene som ble benyttet er derivater av pSIP-vektorene, hvor genekspressjonen indueres ved ekstracellulær tilsetning av et feromon (induseringspeptid) (Sørvig et al. 2003; Sørvig et al. 2005). Det ble i tillegg laget vektorer der Hirep1 og Hirep2 ble translasjonelt koblet til en sekvens som koder for et lite peptid, kalt dendrittisk cellebindende peptid (DC-pep) (Tabell 4.1.). Det har blitt vist at dette peptidet binder seg til dendrittiske celler som stammer fra mennesker og mus, og fører til at fusjonsproduktet blir internalisert i disse cellene (Curiel et al. 2004; Mohamadzadeh et al. 2009).

Hirep1 og Hirep2 ble bestilt som syntetiske gener som var kodon-optimalisert for *L. plantarum* fra GenScript, USA. Totalt fire vektorer ble levert fra dem med Hirep1 og Hirep2 fusjonert til sekvensen for DC-pep både N- og C-terminalt (Tabell 2.4.). Disse ble benyttet for å lage konstrukter hvor målet var å ankre Hirep1 og -2 på overflaten av *L. plantarum*.

### 4.1. Konstruksjon av plasmider for celleveggankring av antigener

De syntetiske genene ble levert i kloningsvektoren pUC57 (Tabell 2.4.), der restriksjonsenzymene *SalI* og *MluI* var satt inn henholdsvis N- og C-terminalt i den åpne leserammen til Hirep-antigenene. pUC57 med Hirep-genet ble kuttet med *SalI* og *MluI*. Hirep-antigenene ble klonet inn i ekspresjonsvektoren pLp\_3050-DC-Ag85B-E6-cwa2 (Øverland 2013). Plasmidet har en sekvens hvor genproduktet vil ankre det fusjonerte proteinet (Hirep-antigenene) til celleveggen via et såkalt LPXTG motiv (se seksjon 1.5.3.). pLp\_3050-DC-Ag85B-E6-cwa2 ble behandlet med de samme restriksjonsenzymene (*SalI/MluI*) for å fjerne antigenet DC-Ag85B-E6 fra ekspresjonsvektoren (Figur 4.1.). DC-

Hirep2 kuttet ut fra pUC57 ble ligert inn i ekspresjonsvektoren og resulterte i pLp\_3050-DC-Hirep2-cwa2. DC-pep, som sitter N-terminalt i sekvensen, blir på denne måten eksponert mest mulig slik at en eventuell interaksjon med dendrittiske celler kan foregå enklest mulig. Figur 4.1. illustrerer tillagingen av plasmidet for induserbar ekspresjon av antigenet Hirep2 koblet til DC-pep, med ankring til celleveggen.

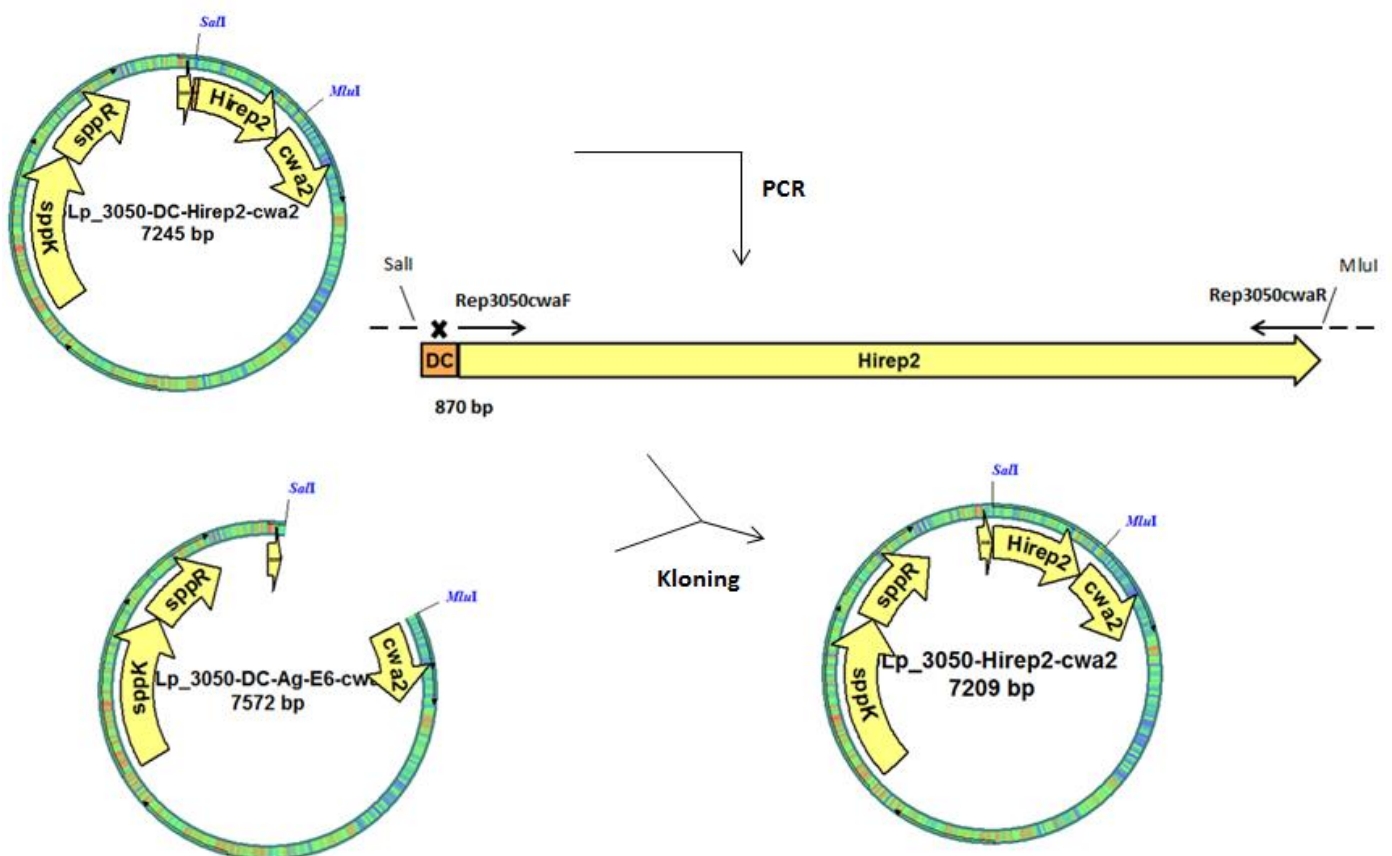


**Figur 4.1. Strategi for å lage pLp\_3050-DC-Hirep2-cwa2 for ankring av DC-Hirep2 til celleveggen.** Vektorer ble behandlet med restriksjonsenzymmer (*SalI/MluI*) for fremskaffelse av lineariserte DNA-molekyler som ble benyttet til å lage pLp\_3050-DC-Hirep2-cwa2 ved liggering. Skjematisert oversikt over konstruert plasmid viser genene: gen for histidinproteinkinase (*sppK*); gen for responsregulator (*sppR*), signalsekvensen Lp\_3050; målgenet Hirep2 (gul) fusjonert til DC-pep (orange); cellevegganker (*cwa2*).

Samme metode og strategi (Figur 4.1.) ble benyttet for å lage pLp\_3050-DC-Hirep1-cwa2, hvor Hirep1 translasjonelt fusjonert til sekvensen for DC-pep ble koblet til samme cellevegganker-sekvens (*cwa2*). Kloningsvektoren pUC57\_DC-Hirep1 (Tabell 2.4.) ble behandlet med de samme restriksjonsenzymene (*SalI/MluI*) for innhenting av målgenet DC-Hirep1.



Det ble også laget konstrukt uten sekvensen for DC-pep, fordi det var ønskelig å finne ut om den sekvensen har betydning for opptak i dendrittiske celler (og en eventuell immunrespons). For konstruksjon av vektor med antigenet Hirep2, uten sekvensen for DC-pep, ankret til celleveggen, ble pLp\_3050-DC-Hirep2-cwa2 benyttet som templat hvor PCR ble utført for å fjerne sekvensen for DC-pep (Figur 4.2.). Både fremoverprimer og reversprimer (Tabell 2.1. og Tabell 2.2.) inkluderte et overheng bestående av baser med homologi til ekspresjonsvektoren som Hirep2 ble klonet inn i. Overhenget i fremoverprimeren (Rep3050cwaF) bevarer restriksjonssetet *Sall*, samtidig som sekvensen for DC-pep utelates.

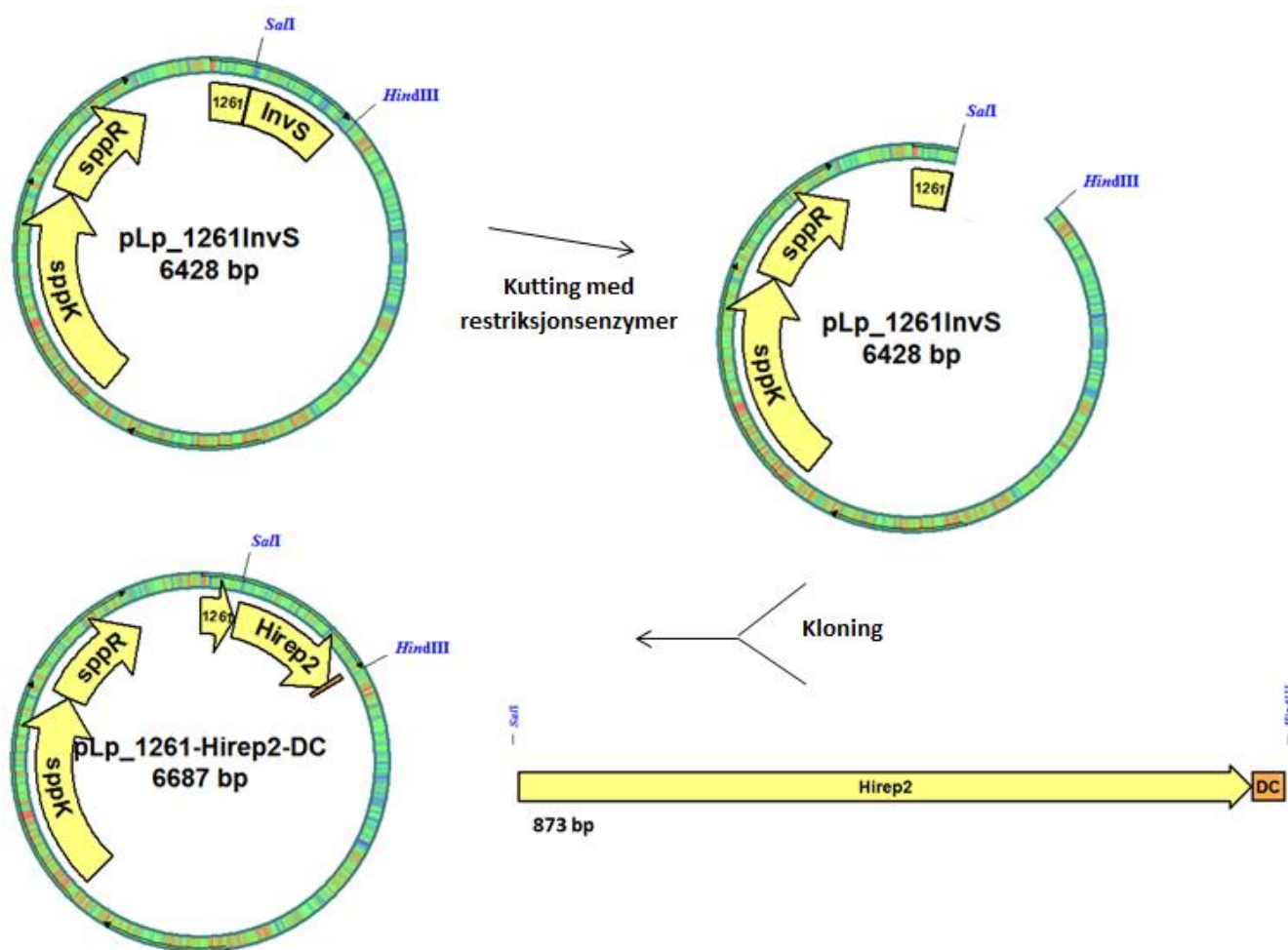


**Figur 4.2. Strategi for å lage pLp\_3050-Hirep2-cwa2 for ankring av Hirep2 til celleveggen.** Det ble utført PCR, der pLp\_3050-DC-Hirep2-cwa2 ble benyttet som templat, for å fjerne sekvensen for DC-pep. Fremover- og reversprimerenes overheng er markert med stiplet linje. PCR-produktet ble klonet, ved hjelp av In-fusion HD Cloning Kit (seksjon 3.8.4.), inn i linearisert vektor for tillaging av pLp\_3050-Hirep2-cwa2. Skjematisert oversikt over konstruert plasmid viser genene: gen for histidin-proteinkinase (*sppK*); gen for responsregulator (*sppR*), signalsekvensen Lp\_3050; målgenet Hirep2; cellevegganker (*cwa2*).

For konstruksjon av pLp\_3050-Hirep1-cwa2 ble samme prosedyre som illustrert i Figur 4.2. benyttet, men med pLp\_3050-DC-Hirep1-cwa2 som templat, H1\_3050cwaF som fremoverprimer og H1\_3050cwaR som reversprimer (Tabell 2.1. og Tabell 2.2.). Disse primerene inkluderte også et overheng med baser homologe til vektoren, og dermed ble restriksjonssetene *SalI* og *MluI* bevart.

### **4.2. Konstruksjon av plasmider for ankring av antigener til cellemembranen**

Lokalisering av et antigen kan ha betydning for en immunrespons (Bermúdez-Humarán et al. 2004; Kajikawa et al. 2011), og det ble derfor laget konstrukter der antigenene ble ankret til cellemembranen for å danne et sammenlikningsgrunnlag til konstrukter med celleveggankring av antigenene. De syntetiske genene ble levert i kloningsvektoren pUC57 (Tabell 2.4.), der restriksjonsenzymene *SalI* og *HindIII* var satt inn henholdsvis N- og C-terminalt i den åpne leserammen til Hirep-antigenene. pUC57 med Hirep-genene ble kuttet med *SalI* og *HindIII*. For å ankre antigenene til cellemembranen ble Hirep-antigenene translasjonelt fusjonert til et lipoprotein-anker (Lp\_1261 (Fredriksen et al. 2012)) fra *L. plantarum*. Ved denne typen ankring til membranen blir proteinet ankret via den N-terminale enden. For å eksponere DC-pep mest mulig for omgivelsene, ble sekvensen til DC-pep koblet til den C-terminale enden av antigenene. Plasmidet pLp\_1261InvS (Fredriksen et al. 2012) ble kuttet med restriksjonsenzymene *SalI* og *HindIII* for å fjerne genet for InvS. Kloningsvektoren pUC57\_Hirep2-DC (Tabell 2.4.) ble kuttet med de samme restriksjonsenzymene (*SalI/HindIII*) for å få ut målgenet Hirep2-DC. Målsekvensen kunne dermed liges inn i vektoren for induserbar ekspresjon og ankring av Hirep2-DC til membranen gjennom et lipoboks-motiv (Figur 4.3.).

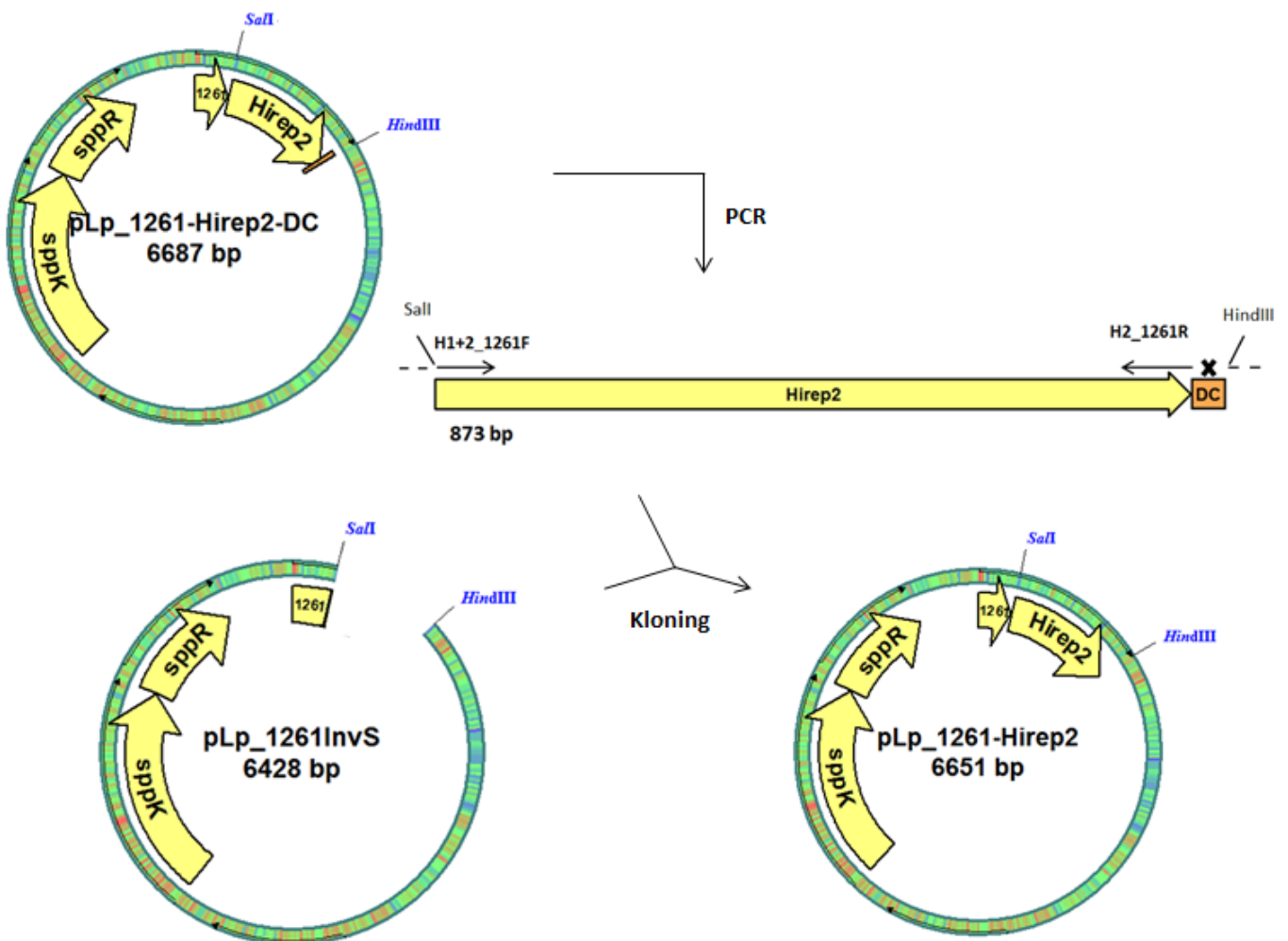


**Figur 4.3. Strategi for å lage pLp\_1261-Hirep2-DC for ankring av DC-Hirep2 til cellemembranen.** Aktuelle DNA-fragmenter ble fremskaffet ved bruk av restriksjonsenzymmer slik at disse kunne ligeres til plasmidet pLp\_1261-Hirep2-DC. Skjematisert oversikt over konstruert plasmid viser genene: gen for histidin-proteinkinase (*sppK*); gen for responsregulator (*sppR*), lipoprotein-ankret Lp\_1261; målgenet Hirep2 (gul) fusjonert til DC-pep (orange).

Fremgangsmåten for konstruksjon av pLp\_1261-Hirep1-DC var analog til plasmidkonstruksjon av pLp\_1261-Hirep2-DC (Figur 4.3.). Eneste forskjell var at kloningsvektoren pUC57\_Hirep1-DC (Tabell 2.4.) ble benyttet som utgangspunkt for fremskaffelse av målgenet Hirep1-DC.

For konstruksjon av plasmid der Hirep2, uten sekvens for DC-pep, ble ankret til cellemembranen, ble det utført PCR med pLp\_1261-Hirep2-DC som templat. Fremoverprimer H1+2\_1261F inneholdt et overheng på 15 baser med homologi til ekspresjonsvektoren (den C-terminale enden av Lp\_1261). Reversprimer H2\_1261R er

designet for å binde den C-terminale enden av Hirep2, samt inkludere et overheng med baser homologe til sekvensen nedstrøms for Hirep2-DC. Ved bruk av disse primerene (Tabell 2.1. og Tabell 2.2.) blir sekvensen for DC-pep ekskludert i PCR-produktet, mens overheng med baser homologe til ekspresjonsvektoren blir inkludert på begge ender av Hirep2 – hvilket betyr at restriksjonssetene *SalI* og *HindIII*, samt stoppkodonet oppstrøms for *HindIII*, bevares. I Figur 4.4. er det skissert hvordan plasmidkonstruksjon av pLp\_1261-Hirep2 ble utført med bruk av PCR på templatet pLp\_1261-Hirep2-DC og kloning.



**Figur 4.4. Strategi for å lage pLp\_1261-Hirep2 for ankring av Hirep2 til cellemembranen.** Plasmidet pLp\_1261-Hirep2-DC ble benyttet som templat for fjerning av sekvensen for DC-pep. Fremover- og reversprimerenes overheng er markert med stiplet linje. PCR-produktet (Hirep2) ble klonet, ved hjelp av In-fusion HD Cloning Kit (seksjon 3.8.4.), inn i vektoren for lipoprotein-ankring, og resulterte i plasmidet pLp\_1261-Hirep2. Skjematisk oversikt over konstruert plasmid viser genene: genen for histidin-proteinkinase (*sppK*); genen for responsregulator (*sppR*), lipoprotein-ankeret Lp\_1261; målgenet Hirep2.

Illustrasjonen i Figur 4.4. kan videreføres for plasmidkonstruksjon av pLp\_1261-Hirep1, der pLp\_1261-Hirep1-DC fungerte som templat for fremoverprimeren H1+2\_1261F og reversprimeren H1\_1261R (Tabell 2.1. og Tabell 2.2.). PCR-produktet i dette tilfellet inneholdt også overheng bestående av baser homologe til vektoren slik at SallI, stoppkodonet og HindIII ble bevart.

### 4.3. Sammenfatning av konstruerte ekspresjonsvektorer

De to hybridantigenene, Hirep1 og Hirep2, ble klonet inn i vektorer for ankring til celleveggen og for ankring til cellemembranen. I tillegg ble det laget plasmider der disse antigenene var koblet til DC-pep på en slik måte at eksponeringen mot dendrittiske celler var størst mulig. I Tabell 4.1. er en oppsummering som forklarer funksjonen til de ulike plasmidene.

**Tabell 4.1. Oversikt over konstruerte ekspresjonsvektorer og deres funksjon.**

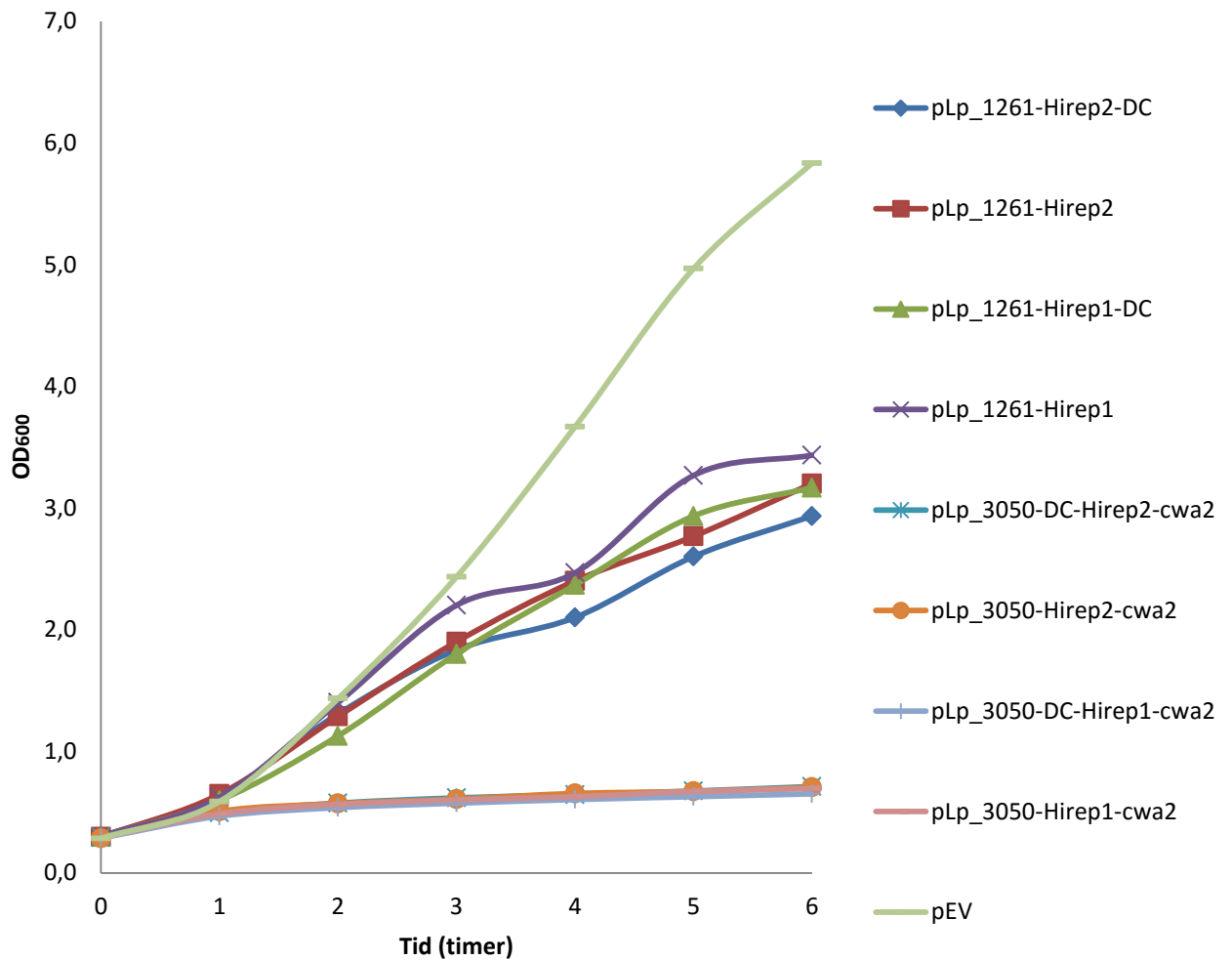
Navn	Funksjon
pLp_3050-DC-Hirep2-cwa2	Produksjon av celleveggankret Hirep2 med DC-pep koblet til den N-terminale delen av antigenet
pLp_3050-Hirep2-cwa2	Produksjon av celleveggankret Hirep2
pLp_3050-DC-Hirep1-cwa2	Produksjon av celleveggankret Hirep1 med DC-pep koblet til den N-terminale delen av antigenet
pLp_3050-Hirep1-cwa2	Produksjon av celleveggankret Hirep1
pLp_1261-Hirep2-DC	Produksjon av membranankret Hirep2 med DC-pep koblet til den C-terminale delen av antigenet
pLp_1261-Hirep2	Produksjon av membranankret Hirep2
pLp_1261-Hirep1-DC	Produksjon av membranankret Hirep2 med DC-pep koblet til den C-terminale delen av antigenet
pLp_1261-Hirep1	Produksjon av membranankret Hirep1

Bekreftelse av riktig plasmidkonstruksjon ble utført ved kutting av restriksjonszymer, der produktene ble analysert ved agarosegelelektroforese for å se om størrelsen på DNA-

fragmentet var i overensstemmelse med hva som var forventet (henholdsvis seksjon 3.8.1. og 3.6.). Påfølgende verifisering av sekvensen til transformerte gen ble utført ved innsendelse av plasmidene til sekvensering hos GATC biotech (seksjon 3.12.). Analyse av sekvensene i CLC DNA Main Workbench 7 (Qiagen) bekreftet riktig sekvens hos alle de konstruerte plasmidene.

#### 4.4. Vekstkurver av *L. plantarum* med ulike plasmider

Veksthastigheten til rekombinante *L. plantarum* ble undersøkt. Dette ble utført for å teste eventuell påvirkning produksjon av de heterologe genproduktene hadde på bakterienes vekst. Fra tidligere forsøk er det kjent at produksjon av heterologe proteiner kan føre til stress hos bakterien som påvirker veksten (Bolhuis et al. 1999; Fredriksen et al. 2010; Lulko et al. 2007; Mathiesen et al. 2008). *L. plantarum* med ulike plasmider ble dyrket over natt. Overnattekulturene ble deretter fortynnet i MRS til OD<sub>600</sub> var 0,10-0,15. Produksjonen av Hirep-variantene ble indusert med 25 ng/ml SppIP når OD<sub>600</sub> var 0,28-0,33. Fra induseringstidspunktet ble OD<sub>600</sub> målt hver time. *L. plantarum* med pEV ble benyttet som kontroll da dette plasmidet ikke har et målgen. Figur 4.5. viser vekstkurvene til de ulike rekombinante bakteriene, og de presenterte resultatene viser gjennomsnittet fra tre uavhengige forsøk. *L. plantarum* med pEV vokser bedre enn alle de andre stammene. Den største markante forskjellen i vekst observeres mellom konstruktene med lipoprotein-anker og cellevegganker. Innad i gruppen av bakterier med lipoprotein-anker og cellevegganker ser de ulike Hirep-antigenene ut til å ha liten innvirkning på veksten. For konstruktene hvor Hirep-variantene ble ankret til celleveggen, stopper veksten nesten opp etter induksjonen. I løpet av de 6 timene OD<sub>600</sub> ble målt, økte OD<sub>600</sub> bare til omtrent 0,70 (fra 0,30). Denne svake økningen i celletetthet skjedde i størst grad den første timen etter induksjonen (Figur 4.5. og Vedlegg, Figur V-1.).



**Figur 4.5. Vekstkurver for rekombinante *L. plantarum*.** Bakteriene ble induisert med SppIP ved tidspunkt 0 ( $OD_{600} \sim 0,3$ ). Etter induksjon ble  $OD_{600}$  målt hver time i til sammen seks timer.

Fra Figur 4.5. er det vanskelig å skille veksten mellom bakteriene med plasmider som ankrer proteinene til celleveggen. I Vedlegg, Figur V-1 er en egen vekstkurve for disse stammene, der en annen skala på aksene for  $OD_{600}$  gjør at stigningen i  $OD_{600}$  over tid er lettere å observere.

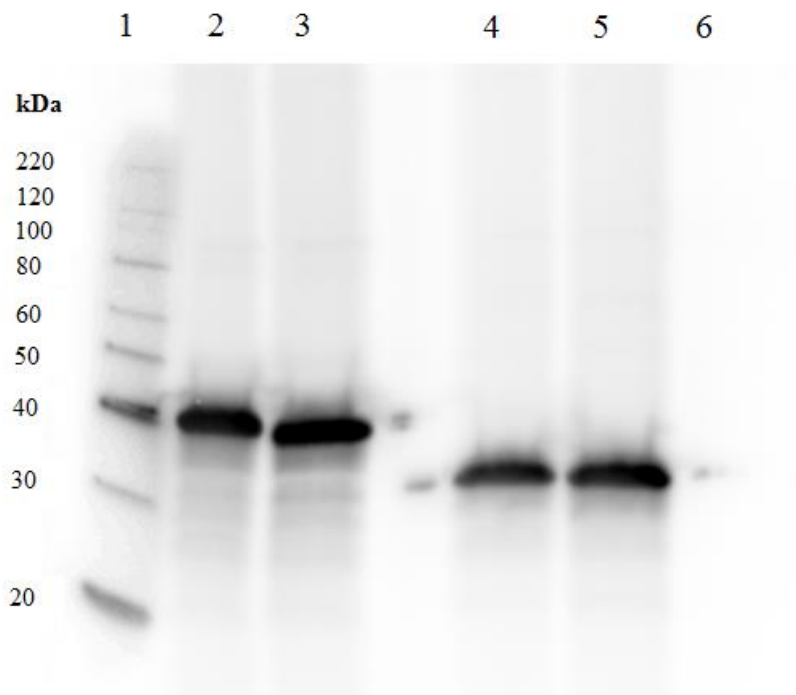
#### 4.5. Deteksjon av antigenproduksjon ved Western blot

For å undersøke om de rekombinante bakteriene produserte antigenene, ble det laget et cellefritt proteinekstrakt fra hver kultur. Kulturene ble høstet tre timer etter induksjon (seksjon 3.13.1.), deretter ble cellene lysert ved hjelp av glasskuler for å lage et cellefritt proteinekstrakt (seksjon 3.13.2.). Opparbeiding av sammenlignbare prøver ble utført ved å ta

## RESULTATER

hensyn til OD<sub>600</sub> ved høstingstidspunktet, hvilket betyr at alle prøvene stammer fra omtrentlig samme mengde celler. Western blot ble utført gjentatte ganger for å optimalisere metoden for bruk av serum antistoff rettet mot Hirep-antigenene, og Figur 4.6. og 4.7. viser de optimaliserte blottene.

Figur 4.6. viser Western blot av cellefritt proteinekstrakt fra *L. plantarum* med plasmider for ankring av antigener via cellemembranen, samt kontrollplasmidet pEV. Antistoffhybridisering av dette blottet ble utført ved tradisjonell metode (seksjon 3.15.3.) og blokkeringsløsningen bestod av TTBS med 5 % tørrmelk. Proteinbåndenes størrelse stemmer bra overens med forventet størrelse, og omtrent lik intensitet indikerer omtrent lik mengde protein hos de ulike bakteriene (Figur 4.6.).

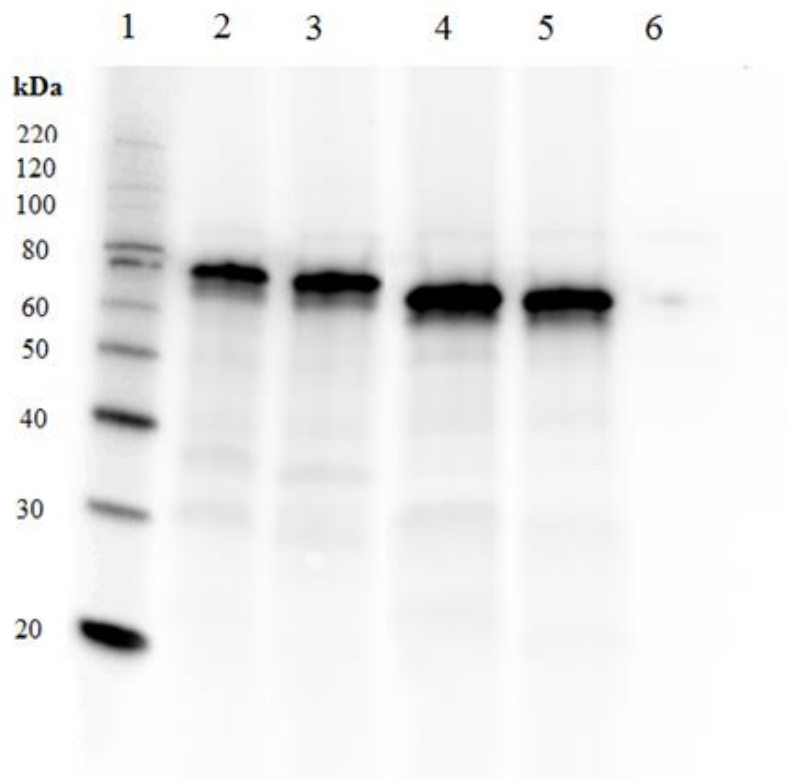


**Figur 4.6. Western blot av cellefritt ekstrakt fra *L. plantarum* med plasmider for ankring av antigener til cellemembranen. (1) MagicMark<sup>TM</sup> XP Western Protein Standard; (2) pLp\_1261-Hirep2-DC (37 kDa); (3) pLp\_1261-Hirep2 (35 kDa); (4) pLp\_1261-Hirep1-DC (29 kDa); (5) pLp\_1261-Hirep1 (28 kDa); (6) pEV. Teoretisk molekylmasse av antigenene er markert i parentes.**

I Figur 4.7. er resultatet fra Western blot av cellefritt proteinekstrakt fra *L. plantarum* med plasmider for celleveggankring av antigenene. Antistoffhybridiseringen for dette blottet ble utført ved samme metode som for det presentert i Figur 4.6. Alle antigenene fra plasmidene med cellevegganker viser en større molekylmasse ved Western blot enn den beregnede



teoretiske molekylmassen (se figurtekst 4.7.). Intensiteten på proteinbåndene varierer litt i styrke, der bakteriene med celleveggankret Hirep2 og DC-Hirep2 (prøve 2 og 3 i Figur 4.7.) er litt svakere i intensitet enn celleveggankret Hirep1 og DC-Hirep1 (prøve 4 og 5 i Figur 4.7.). Dette kan være en indikasjon på at det er ulik mengde protein hos de forskjellige bakteriene.



**Figur 4.7. Western blot av cellefritt ekstrakt fra *L. plantarum* med plasmider for ankring av antigener til celleveggen.** (1) MagicMark<sup>TM</sup> XP Western Protein Standard; (2) pLp\_3050-DC-Hirep2-cwa2 (49 kDa); (3) pLp\_3050-Hirep2-cwa2 (48 kDa); (4) pLp\_3050-DC-Hirep1-cwa2 (42 kDa); (5) pLp\_3050-Hirep1-cwa2 (41 kDa); (6) pEV. Teoretisk molekylmasse av antigenene er markert i parentes.

Som nevnt viser Figur 4.6. og 4.7. de optimaliserte Western blot-resultatene. Ved de første Western blottene viste antistoffet uspesifikke bindinger og muligens nedbrytningsprodukter. Ulike optimaliseringstrinn ble testet for å forsøke og fjerne bakgrunnen. Det ble testet tørrmelk i blokkeringsløsningen i stedet for 3 % BSA (måtte da benytte tradisjonell metode for antistoffhybridisering (seksjon 3.15.3.)). Videre ble det forsøkt å tilsette proteasehemmer til høstede bakterier i forkant av preparering av cellelysate (seksjon 3.13.2), og å endre mengden primærantistoff og sekundærantistoff benyttet i hybridiseringen.

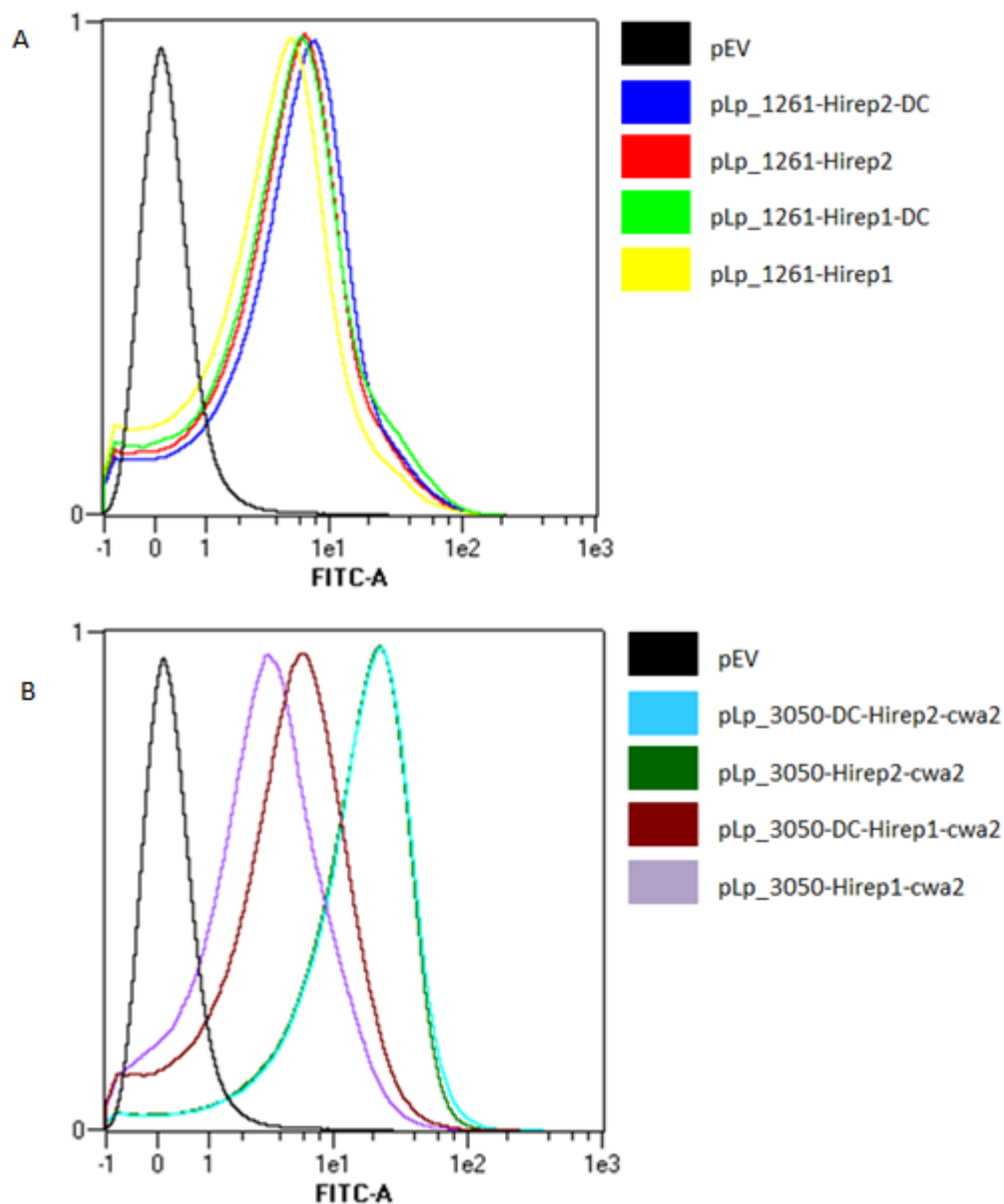
Noen eksempler på optimaliseringstrinnene er vist i Vedlegg, Figur V-2. Ved disse blottene ble det benyttet andre mengder med primær- og sekundærantistoff under antistoffhybridiseringen enn hva tilfellet var for analysene presentert i Figur 4.6. og 4.7. Eneste forbedringen under optimaliseringsforsøket vist i Figur V-2. vises ved bruk av tørrmelk i blokkeringsløsningen (Figur V2-C.), der uspesifikk binding av antistoff til båndene som er markert med piler (i Figur V-2B.) er forsvunnet. Ved analysene presentert i Figur 4.6. og 4.7. ble det benyttet en mindre mengde primærantistoff og større mengde sekundærantistoff (seksjon 3.15.3.) enn hva som ble benyttet i blottene vist i Figur V-2. Som diskutert i seksjon 5.3. foreligger det indikasjoner på at endringen i antistoffkonsentrasjonen hadde størst betydning for nedgangen i bakgrunn, altså at bakgrunnen skyldtes usepsifikke bindinger og ikke nedbrytningsprodukter.

#### **4.6. Deteksjon av antigenenes overflatelokalisering ved strømningscytometri**

Strømningscytometri ble benyttet for å analysere om antigenene ble sekretert ut av bakterien og festet på overflaten av *L. plantarum*. Tre timer etter induksjon ble kulturene høstet (seksjon 3.13.1.), og bakteriecellene ble inkubert med primærantistoff rettet mot Hirep-antigenene. Etterfølgende inkubering med et sekundærantistoff (konjugert med FITC) som binder primærantistoffet, gjorde at overflatelokalisererte antigener ble detektert ved strømningscytometri (seksjon 3.17.1. for detaljer).

Resultatene presentert i Figur 4.9. er av rekombinante bakterier som ble farget med FITC og analysert samme dag som høstingen fant sted. Resultatene er presentert i histogrammer, der relativ fluorescens av FITC (x-aksen) er plottet mot antallet fluorescerende celler (y-aksen) (y-aksen er imidlertid normalisert i Figur 4.10 og andre histogrammer vist i denne oppgaven). Styrken på det fluorescerende signalet er dermed sterkere dess lengre kurven er forskjøvet mot høyre. Det ble ikke detektert fluorescerende signal hos negativ kontroll, pEV. Hos alle konstruerte plasmider for ankring av *C. trachomatis* hybridantigener detekteres positivt fluorescerende signal sammenliknet med negativ kontroll. Sterke signaler registreres hos konstruktene med celleveggankring av antigenet Hirep2, både med og uten DC-pep. Dette indikerer at sekvensen til DC-pep ikke har betydning for bakteriens evne til å sekretere og feste antigenene på overflaten, noe som stemmer overens med resultatene til Øverland (2013). Alle plasmidene for ankring av antigenene til cellemembranen viser omtrent samme

fluorescerende signalstyrke, mens plasmidene for ankring av antigenene til celleveggen viser varierende signalstyrke.



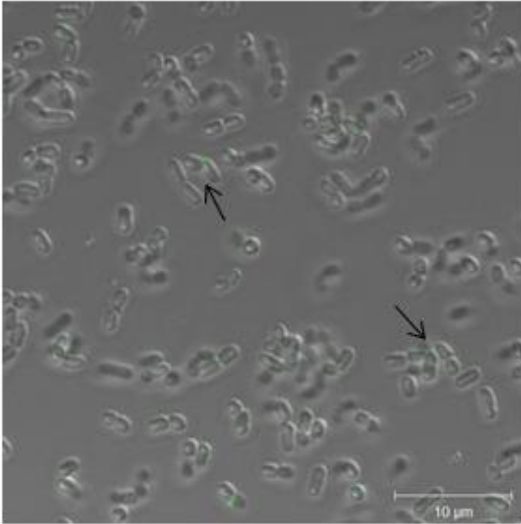
**Figur 4.9. Strømningscytometri av rekombinante bakterier farget med FITC.** A) resultater fra strømningscytometri av *L. plantarum* med ankring av antigenene til cellemembranen; B) resultater fra strømningscytometri av *L. plantarum* med ankring av antigenene til celleveggen. X-aksen viser intensiteten på det fluorescerende signalet. Fargekodene for de ulike konstruktene er indikert i figuren.

Som en kontroll for å verifisere at primærantistoffet bandt antigenene, og ikke lipoprotein-ankeret, ble *L. plantarum* med pLp\_1261-Ag85B-E6-DC (Øverland 2013) inkludert i en analyse. Resultatene viser at primærantistoffet ikke bandt seg til ankeret, men til antigenene Hirep1 og Hirep2 (Vedlegg, Figur V-3.). Den samme trenden som i Figur 4.9., der

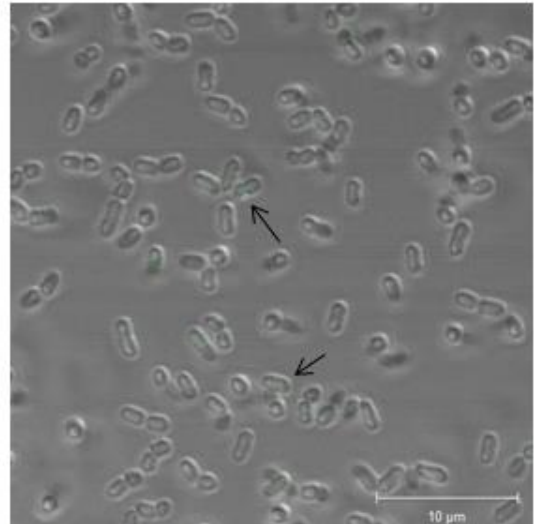
celleveggankret Hirep2 og DC-Hirep2 viste sterkest fluorescerende signal, er ikke til stedet i Figur V-3B. Der vises omtrent lik intensitet på det fluorescerende signalet hos alle de rekombinante *L. plantarum* med Hirep-antigenene.

### **4.7. Deteksjon av antigenenes overflatelokalisering ved konfokal laserskanning-mikroskopi**

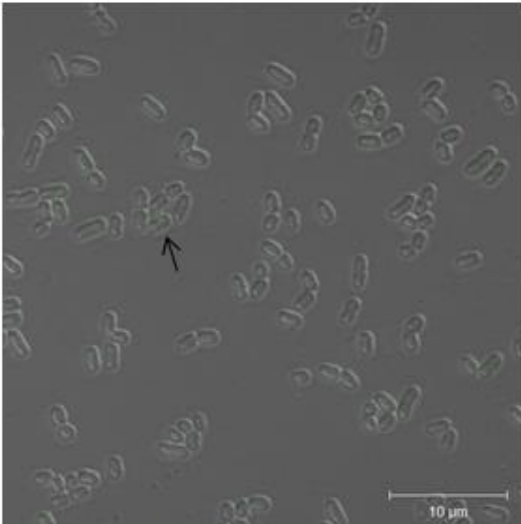
En annen metode for å analysere om antigenene var festet på overflaten av *L. plantarum* var konfokal laserskanning-mikroskopi. Denne metoden ble også benyttet for å undersøke om man kunne se en mer spesifikk lokalisering av antigenene. Tidligere forsøk har vist at fluorescenssignalet, detektert ved konfokal laserskanning-mikroskopi, har hatt en ujevn fordeling på celleoverflaten. Fluorescenssignalet har da vært tydeligst ved septum eller i konsentrerte flekker på overflaten (Fredriksen et al. 2012). Resultatene i Figur 4.10. er en analyse som er utført på samme bakteriepopulasjon (og samme farging med FITC) som resultatene fra strømningscytometri-analysen presentert i seksjon 4.6. Resultatene viser god overensstemmelse med resultatene fra strømningscytometrien, der sterkest fluorescerende signal observeres hos pLp\_3050-DC-Hirep2-cwa2 og pLp\_3050-Hirep2-cwa2. Det ble ikke observert fluorescerende bakterier hos negativ kontroll, pEV.



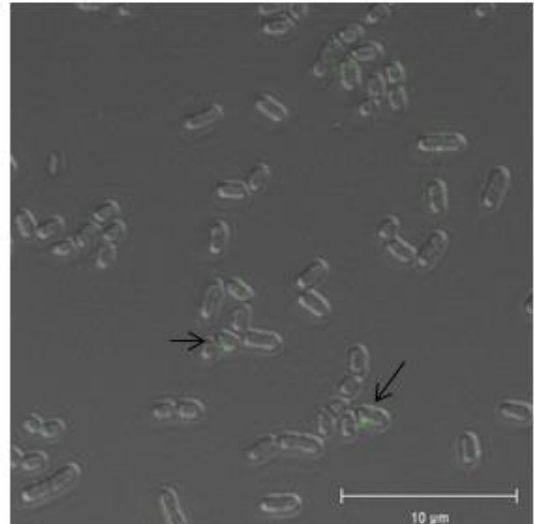
pLp\_1261-Hirep2-DC



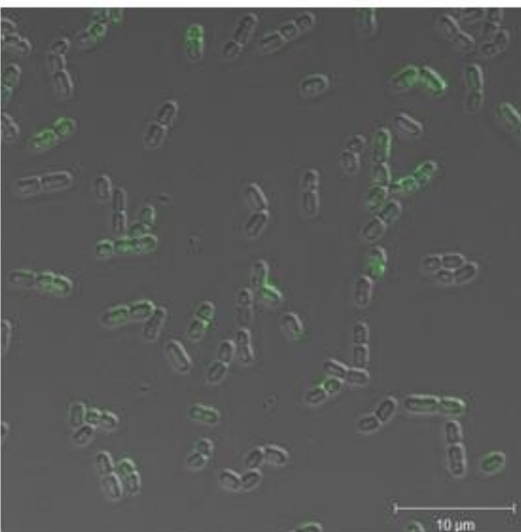
pLp\_1261-Hirep2



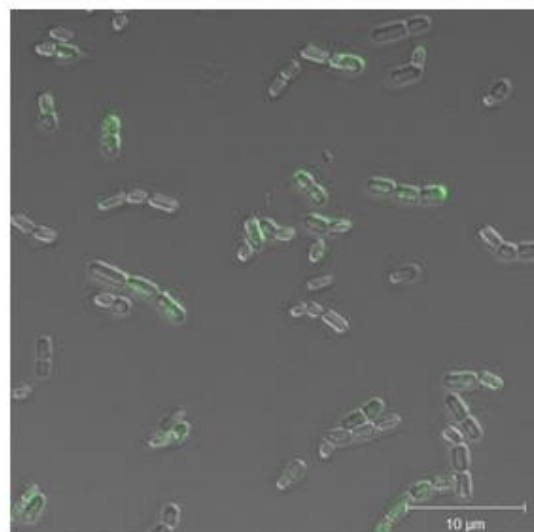
pLp\_1261-Hirep1-DC



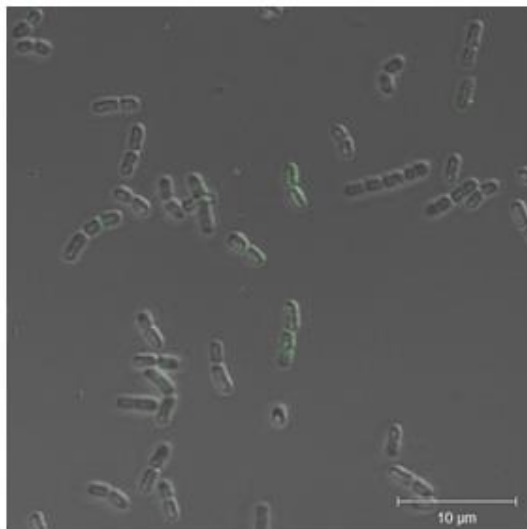
pLp\_1261-Hirep1



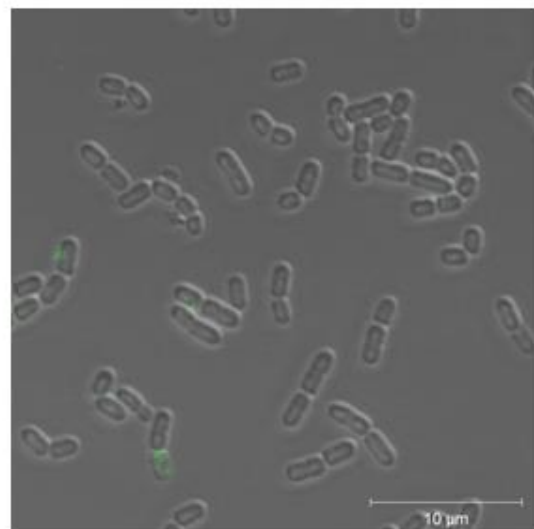
pLp\_3050-DC-Hirep2-cwa2



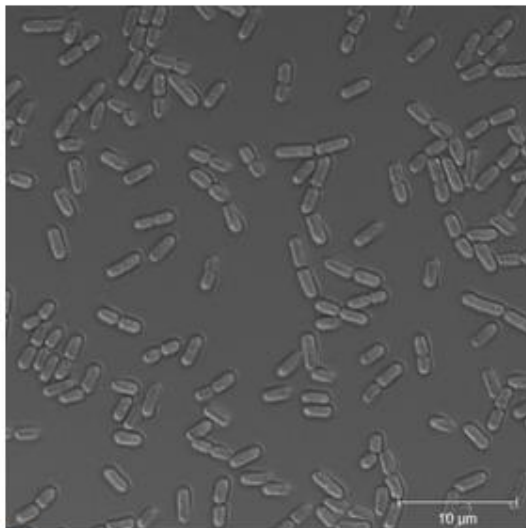
pLp\_3050-Hirep2-cwa2



pLp\_3050-DC-Hirep1-cwa2



pLp\_3050-Hirep1-cwa2



pEV

**Figur 4.10. Konfokal laserskanning-mikroskopi av rekombinante *L. plantarum*.**

Bakteriene ble farget med FITC for deteksjon av overflatelokalisererte antigener. Pilene i de øverste bildene fremhever fluorescerende celler. Navnene på de ulike konstruktene er angitt under hvert bilde.

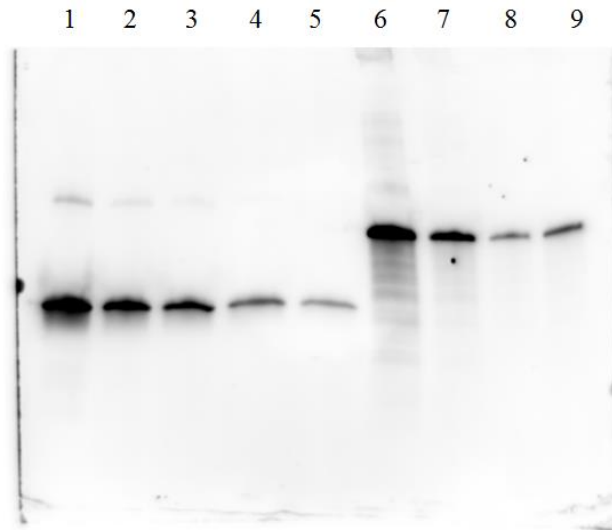
**4.8. Estimering av antigenmengde ved semi-kvantitativ Western blot av cellelysat**

Ved bruk av rekombinante *L. plantarum* som vaksine bør man vite hvor mye man administrerer. Et estimat av mengden antigen i en gitt mengde bakterier ble beregnet ved hjelp av en semi-kvantitativ Western blot-analyse. Totalmengden antigen i cellelysat ble estimert, da antigener med intracellulær lokalisasjon antas å ha betydning for en eventuell immunrespons, i tillegg til de overflatelokalisererte antigenene.

To ulike metoder for å lysere bakteriene ble i første omgang testet, da det var viktig at cellene ble ordentlig lysert for å få et best mulig estimat. Den ene metoden baserte seg på å utsette bakteriene for et kulde-varme sjokk, der fryst bakteriepellet ble tint før nedfrysning ved  $-80^{\circ}\text{C}$  i 15 min etterfulgt av inkubering i kokende vannbad i 15 min. Den andre metoden baserte seg på behandling med lysozym og mutanolysin, slik det er beskrevet i seksjon 3.18.1. Forskjellen i dette innledende forsøket fra beskrivelsen i 3.18.1., var at etter inkuberingen med 125  $\mu\text{l}$  GTE-buffer, lysozym og mutanolysin, ble suspensjonen sentrifugert og supernatanten fjernet. En proteingelelektroforese avslørte tydelig forskjell mellom de to metodene (Vedlegg, Figur V-4), der behandling med lysozym og mutanolysin klart var den beste metoden for å lysere bakteriene.

I det innledende forsøket beskrevet ovenfor, ble supernatanten etter behandling med lysozym og mutanolysin fjernet. Det ble videre undersøkt om supernatanten inneholdt Hirep2-antigenet. Dette ble gjort ved Western blot, der 10  $\mu\text{l}$  av supernatanten ble kjørt på proteingelelektroforese i forkant av blottingen. Resultatet viste at supernatanten inneholdt relativt store mengder av Hirep2 (Vedlegg, Figur V-5). På bakgrunn av disse forsøkene ble prosedyren presentert i seksjon 3.18. benyttet til estimering av antigenmengde i en bestemt mengde bakterier.

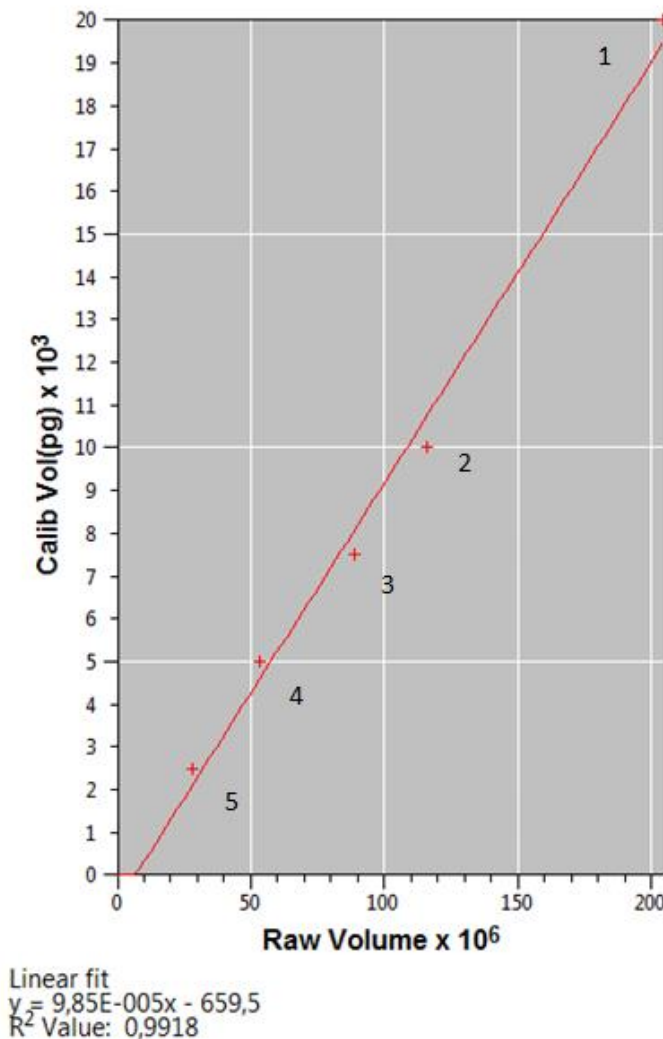
En proteinløsning med kjent konsentrasjon var en forutsetning for gjennomførelse av metoden. Analyseprogrammet AzureSpot ble benyttet til å lage en standardkurve over en fortynningsrekke av Hirep1 med kjent konsentrasjon (Fig 4.12; brønn 1-5). Dette ble gjort ved at proteinbåndene med kjent konsentrasjon ble manuelt markert, og programvaren lagde deretter en standardkurve over de oppgitte konsentrasjonene. En fortynningsrekke ble i tillegg laget fra cellelysat fra  $1 \times 10^9$  bakterier, og standardkurven til proteinet ble benyttet til kalkulering av total antigenmengde basert på prøvene med cellelysat som lå innenfor standardkurvens verdier. Resultatet (6,9  $\mu\text{g}$ ) representerer et gjennomsnitt fra tre forsøk. Figur 4.12. viser Western blottet fra ett av disse forsøkene.



**Figur 4.12. Western blot for semi-kvantitativ bestemmelse av mengden antigen.** Høstede bakterier ( $1 \times 10^9$ ) av *L. plantarum* med plasmidet pLp\_1261-Hirep2-DC ble lysozymbehandlet i forkant av analysen for fremskaffelse av cellelysat. (1) Hirep1 – 20,0 ng; (2) Hirep1 – 10,0 ng; (3) Hirep1 – 7,5 ng; (4) Hirep1 – 5,0 ng; (5) Hirep1 – 2,5 ng; (6) pLp\_1261-Hirep2-DC 1:20; (7) pLp\_1261-Hirep2-DC 1:30; (8) pLp\_1261-Hirep2-DC 1:40; (9) pLp\_1261-Hirep2-DC 1:50. Konsentrasjonen/fortynningen til de ulike prøvene er angitt.

Standardkurven i Figur 4.13. viser sammenhengen mellom konsentrasjonen til Hirep1 i fortynningsrekken (y-aksen) og styrken på båndene (x-aksen) registrert av programvaren AzureSpot. Programvaren benyttet denne standardkurven til estimering av antigenkonsentrasjonen i cellelysat-prøvene. Figur 4.13. viser standardkurven fra ett av forsøkene, og kurven er laget basert på blottet vist i Figur 4.12.





**4.13. Standardkurve for proteinløsning av Hirep1.** Konsentrasjonen (y-aksen) er plottet mot intensiteten på proteinbåndene (x-aksen) etter en Western blot-analyse. Tallene ved hvert punkt indikerer hvilke prøver (brønnene i Figur 4.13.) som ble benyttet i tillagingen av standardkurven; (1) Hirep1 – 20,0 ng; (2) Hirep1 – 10,0 ng; (3) Hirep1 – 7,5 ng; (4) Hirep1 – 5,0 ng; (5) Hirep1 – 2,5 ng (se også Figur 4.12.).

Ved å ta hensyn til fortynningsfaktorene ble det beregnet at  $1 \times 10^9$  bakterier av *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC inneholdt 6,9 µg antigen. Disse utregningene ble basert på gjennomsnittet fra tre forsøk (Figur 4.12. og 4.13. representerer ett av forsøkene), der beregnet antigenkonsentrasjon i hvert av forsøkene var 9,190737 µg, 5,594353 µg og 5,817345833 µg. Rådata fra ett av forsøkene (samme forsøk som presentert her) og utregning av estimatet vises i Vedlegg, henholdsvis Tabell V-2 og Tabell V-3.

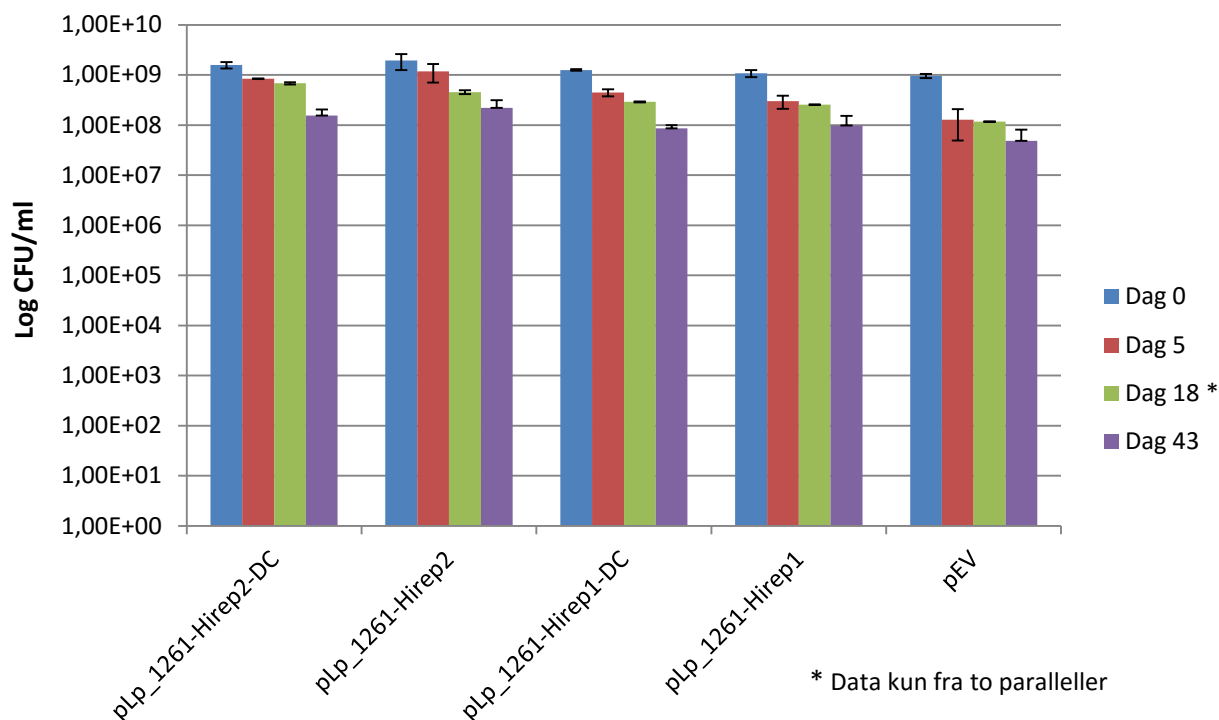
### 4.9. Frysetørking av induerte *L. plantarum*

Ved bruk av rekombinante bakterier, med *C. trachomatis* antigener ankret på overflaten, i en eventuell vaksine er det viktig å kunne lagre induerte bakterier på en enkel måte.

Frysetørking er en metode som kan muliggjøre lagring av bakteriene ved romtemperatur.

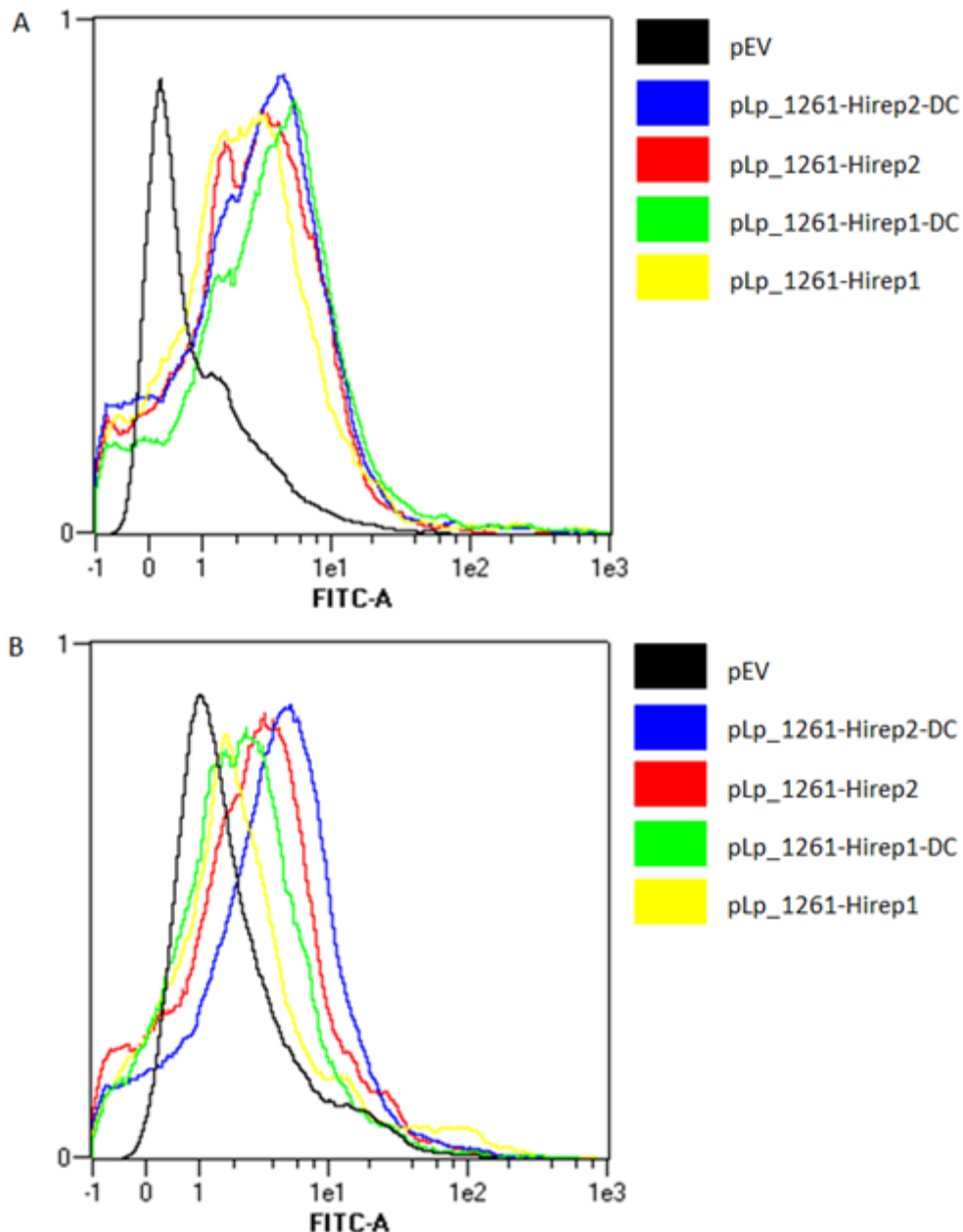
Melkesyrebakterier som suspenderes i tørrmelk i kombinasjon med ulike sukker eller sukkeralkoholer i forkant av en frysetørkingsprosess, har vist økt levedyktighet under påfølgende lagring (Carvalho et al. 2002). Basert på tidligere eksperimenter utført av Carvalho et al. (2002) og Øverland (2013), ble frysetørkingsmedium med 11 % tørrmelk (w/v) og 12,5 g/L fruktose benyttet (seksjon 3.16. for detaljer).

Det ble utført et forsøk for å teste levedyktigheten til frysetørkede *L. plantarum* med plasmider for ankring av antigener til cellemembranen. Dette ble gjennomført ved å dokumentere «colony forming unit per ml» (CFU/ml) på dag 0 (før frysetørkingen), og dag 5, 18 og 43 etter frysetørkingsprosessen startet (CFU/ml ble bestemt ved lik metode som beskrevet nederst i seksjon 3.13.1.). Bakterier ble hydrert ved tilsetning av 1 ml sterilt dH<sub>2</sub>O før en fortynningsrekke i Ringer løsning ( $10^{-2}$ - $10^{-8}$ ) ble laget. Videre ble 100 µl fra fortyningene platet ut på MRS-agar med 5-10 µg/ml Erytromycin (tre paralleller), og antallet kolonier ble registrert etter inkubering ved 30 °C i 48 timer. Resultatene presentert i Figur 4.14. viser gjennomsnittet fra tre uavhengige forsøk. På dag 43 var levedyktigheten 5-11 % av hva den var på dag 0 (før frysetørkingsprosessen startet). Uventet nok var overlevelsesprosenten lavest for *L. plantarum* med plasmidet pEV.



**Figur 4.14. Levedyktigheten til frysetørkede *L. plantarum*.** Figuren viser levedyktigheten til rekombinante *L. plantarum* før frysetørkingsprosessen (dag 0), og etter frysetørkingen på dag 5, 18 og 43.

For å undersøke om frysetørkingen hadde påvirkning på antigenenes lokalisering, ble det utført en strømningscytometri-analyse på dag 9 og 44 etter frysetørkingsprosessen startet (Figur 4.15.). Det fluorescerende signalet er ikke like sterkt (forskjøvet mot høyre) ved dag 44 etter frysetørkingen (Figur 4.15.B.) som det var ved dag 9 etter frysetørkingen (Figur 4.15.A.). Ved dag 44 etter frysetørkingen observeres det i tillegg en liten forskyvning av pEV (4.15.B.). Resultatene vist i Figur 4.15. viser heller ikke like sterkt fluorescerende signal fra FITC som bakteriene analysert i Figur 4.9. og Figur V-3. Dette kan gi en indikasjon på at frysetørkingen og påfølgende lagringstid påvirker antigenene lokalisering på overflaten i noe grad. Resultatene indikerer likevel at flere bakterier har overflatelokalisererte antigener etter utsettelse for en frysetørkingsprosess.



**Figur 4.15. Strømningscytometri av frysetørkede *L. plantarum*.** Strømningscytometri av frysetørkede bakterier ble utført for å undersøke om antigenene var lokalisert på overflaten av bakteriene. A) resultater fra analysen utført på dag 9 etter frysetørkingsprosessen ble startet; B) resultater fra analyse utført på dag 44 etter frysetørkingsprosessen ble startet. X-aksen viser intensiteten på det fluorescerende signalet. Fargekodene for de ulike konstruktene er indikert i figuren.

#### 4.10. Korttidslagring av induuerte *L. plantarum*

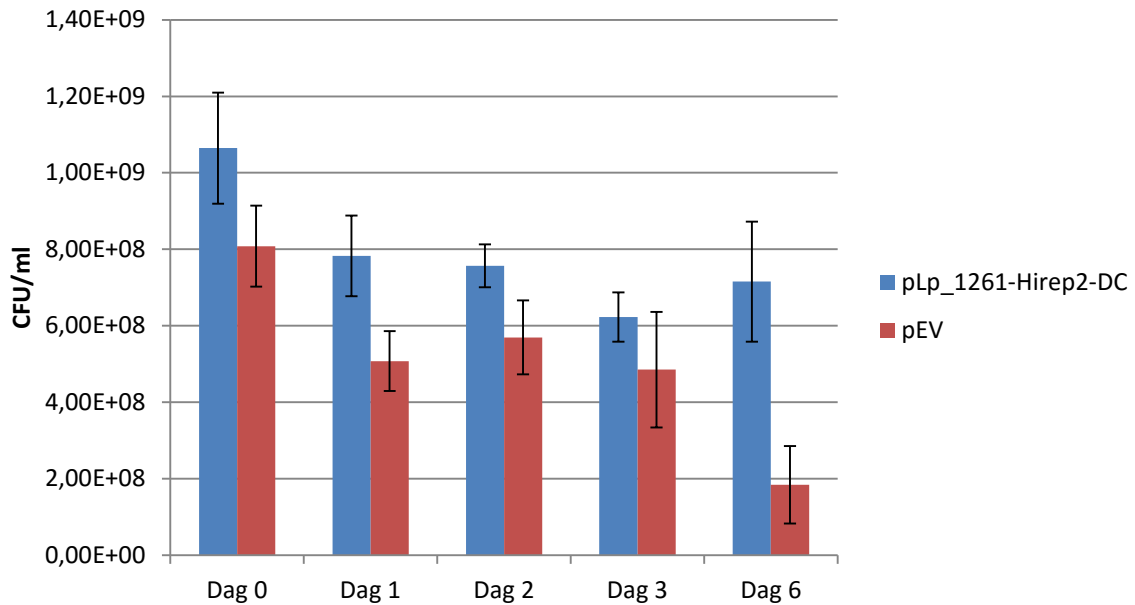
Det ble også utført et forsøk der induuerte, rekombinante *L. plantarum* ble oppbevart ved 4 °C i kjøleskap i ett døgn og i isoporboks med kjøleelementer i de påfølgende døgnene. Dette forsøket ble satt opp med tanke på å simulere en forsendelse, og levedyktigheten ble testet ved å registrere CFU/ml (ble bestemt ved lik metode som beskrevet nederst i seksjon 3.13.1.). Det

ble undersøkt om antigenene var lokalisert på bakterieoverflaten ved strømningscytometri, og en Western blot-analyse ble gjort for å sjekke eventuell dannelse av nedbrytningsprodukter under lagringen.

Det ble høstet  $1 \times 10^9$  bakterier av *L. plantarum* med pEV og pLp\_1261-Hirep2-DC tre timer etter induksjon (seksjon 3.13.1.). På dag 0-3 og 6 ble bakteriepelletene resuspendert i 1 ml sterilt dH<sub>2</sub>O før en fortynningsrekke i Ringer løsning ( $10^{-2}$ - $10^{-8}$ ) ble laget. Videre ble 100 µl fra fortynningene platet ut på MRS-agar med 5-10 µg/ml Erytromycin (tre paralleller), og antallet kolonier ble registrert etter inkubering ved 30 °C i 48 timer. Resultatene presentert i Figur 4.16. viser gjennomsnittet fra tre ulike kulturer.

Levedyktigheten over tid ved lagringsforsøket er vist i Figur 4.16. For *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC observeres det en nedgang i levedyktigheten på 29 % fra dag 0 til dag 2, og en nedgang på 33 % fra dag 0 til dag 6. Til sammenlikning er nedgangen i levedyktighet for *L. plantarum* med pEV 30 % fra dag 0 til 2, og hele 77 % fra dag 0 til dag 6.

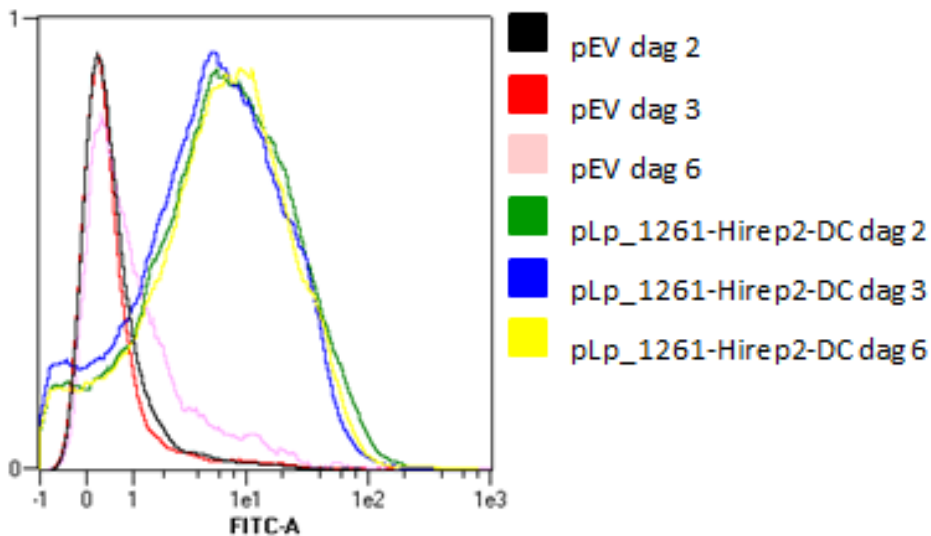
Standardavviket for beregnet CFU/ml på dag 6 for *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC er imidlertid relativt stort, men nedgangen i levedyktighet frem til dette tidspunktet indikerer likevel en tydelig forskjell mellom de to stammene. Samme fenomen ble også observert ved frystørking (Fig 4.14), selv om forskjellen der ikke var like prominent. På dag 6 er CFU/ml for pLp\_1261-Hirep2-DC  $7,16 \times 10^8$ , og antallet levende bakterier er fortsatt høyt.



**Figur 4.16. Levedyktighet av *L. plantarum* ved korttidsoppbevaring.** Fra dag 0 til dag 1 ble bakteriene oppbevart i kjøleskap ved 4 °C. Fra dag 1 til dag 6 ble bakteriene oppbevart i en isoporboks med kjøleelementer for å simulere en eventuell forsendelse. Figuren viser levedyktigheten til bakteriene fra dag 0 til 3, samt dag 6. Resultatene er basert på data fra tre ulike kulturer.

På dag 2, 3 og 6 ble det utført en strømningscytometri-analyse for å undersøke om antigenene fortsatt var lokalisert på overflaten av *L. plantarum*. Figur 4.17. viser resultatene fra denne analysen, og det observeres ingen forskjell i resultatene fra de ulike dagene.

Fluorescensintensiteten er i tillegg omtrent lik som i Figur 4.9. der resultatene viser analysen utført samme dag som høstingen.

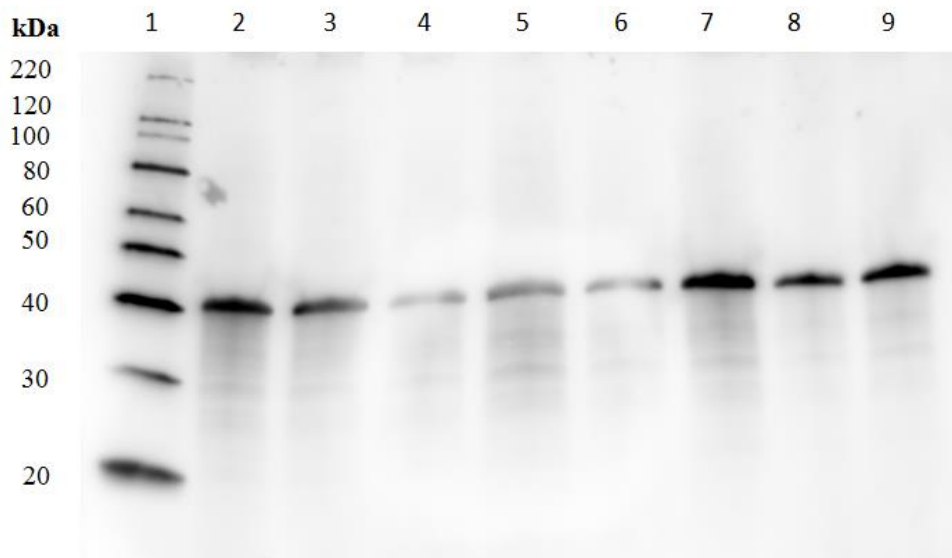


**Figur 4.17. Strømningscytometri av korttidsoppbevarte *L. plantarum*.**

Strømningscytometri av bakterier oppbevart som pellet ved 4 °C (fra dag 0 til 1) og i isoporboks med kjøleelementer de resterende dagene, ble utført for å undersøke om antigenene var lokalisert på overflaten av bakteriene. Analysen ble utført på dag 2, 3 og 6. X-aksen viser intensiteten på det fluorescerende signalet. Fargekodene for de ulike konstruktene er indikert i figuren.

Fra dag 1-3 og dag 6 ble et rør med bakteriepellet fra hver stamme plassert ved -20 °C. Disse prøvene ble lysozymbehandlet (se trinn 4.-6. i seksjon 3.18.1) i forkant av en Western blot-analyse der formålet var å registrere eventuelle nedbrytningsprodukter dannet under lagringsperioden. Prosedyren ble utført på omtrent samme måte som beskrevet i seksjon 3.18.2. (trinn 1.-4.), bortsett fra at det kun ble laget 1:20 og 1:50 fortykning av lyserte bakterier, samt at rensset Hirep1-proteinløsning ikke ble benyttet.

Figur 4.18 viser at det ikke foregikk noen synlig nedbryting av antigen Hirep2-DC under korttidslagringen av bakteriepelletter.



**Figur 4.18. Western blot av lysozymbehandlede bakterier fra lagringsforsøk. (1)** MagicMark™ XP Western Protein Standard; (2) dag 1 - 1:20; (3) dag 2 - 1:20; (4) dag 3 - 1:20; (5) dag 6 - 1:20; (6) dag 1 - 1:50; (7) dag 2 - 1:50; (8) dag 3 - 1:50; (9) dag 6 - 1:50. Prøve 2-9 er lysozymbehandlede *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC. Hvilken dag fra lagringsforsøket prøvene stammer fra, samt fortynningen av lysozymbehandlet bakteriesuspensjon, er angitt.

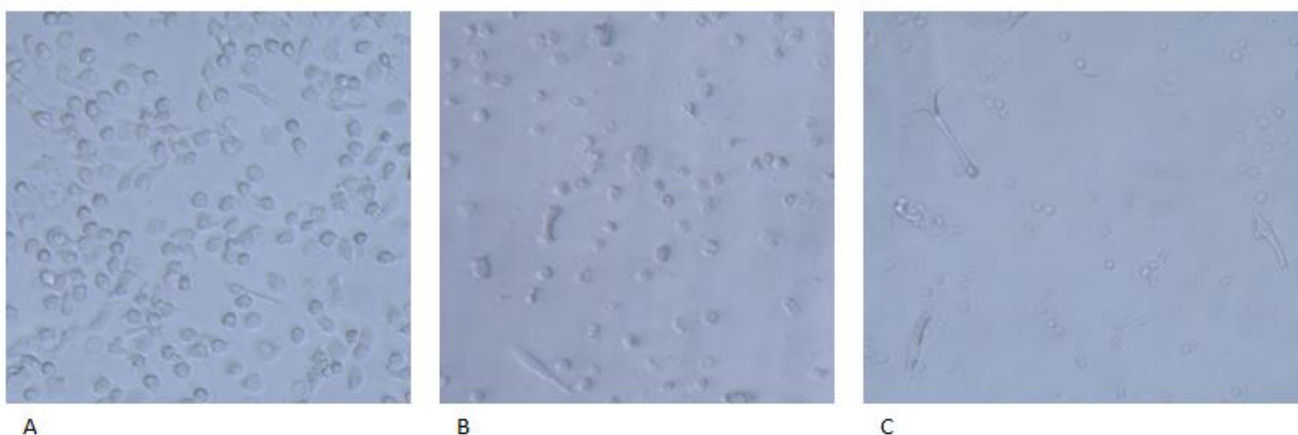
#### 4.11. Opptak av rekombinante *L. plantarum* i dendrittiske celler

Sekvensen til DC-pep ble translasjonelt koblet til noen av konstruktene (Tabell 4.1.). Dette ble utført med bakgrunn i tidligere forskning som har vist at retting av antigener mot dendrittiske celler har økt opptaket av leveringsvektoren (Christophe et al. 2015), og at DC-pep koblet til antigen har gitt økt immunrespons hos mus sammenliknet med antigener uten DC-pep (Mohamadzadeh et al. 2009). For å teste om DC-pep translasjonelt koblet til Hirep-antigenene medførte økt opptak i dendrittiske celler, ble et ekstra plasmid, pValac-GFP (Guimarães et al. 2009), benyttet. pValac-GFP inneholder et gen for «green fluorescent protein» (GFP), og dette genet ligger under kontroll av en cytomegalovirus promotor som gjenkjennes i eukaryotiske celler. De rekombinante bakteriene med Hirep-antigenene ble transformert med plasmidet pValac-GFP (inneholdt dermed to plasmider). Tanken bak forsøket var at GFP kun uttrykkes etter at rekombinante *L. plantarum* har blitt tatt opp i dendrittiske celler, da påfølgende lysis av bakteriene vil gjøre at promotoren gjenkjennes av de dendrittiske cellene. Dermed kan eventuelle forskjeller i opptak av de rekombinante bakteriene (med og uten DC-pep) i dendrittiske celler følges, da GFP kan detekteres med blant annet strømningscytometri.



Monocyttene, positive for markøren CD14, ble isolert fra perifere blodleukocytter (PBL) ved bruk av en magnetisk separasjonsmetode (se seksjon 3.19.1.). CD14-markøren gjør at monocytterne kan differensiere til dendrittske celler hvis vekstmediet inneholder cytokinene interleukin 4 (IL-4) og «granulocyte-macrophage colony-stimulating factor» (GM-CSF). Seks dager etter isolering var cellene ferdig differensiert, og de dendrittske cellene ble ko-inkubert med bakterier (100 bakterier per dendrittske celle), se seksjon 3.19.2. for detaljer.

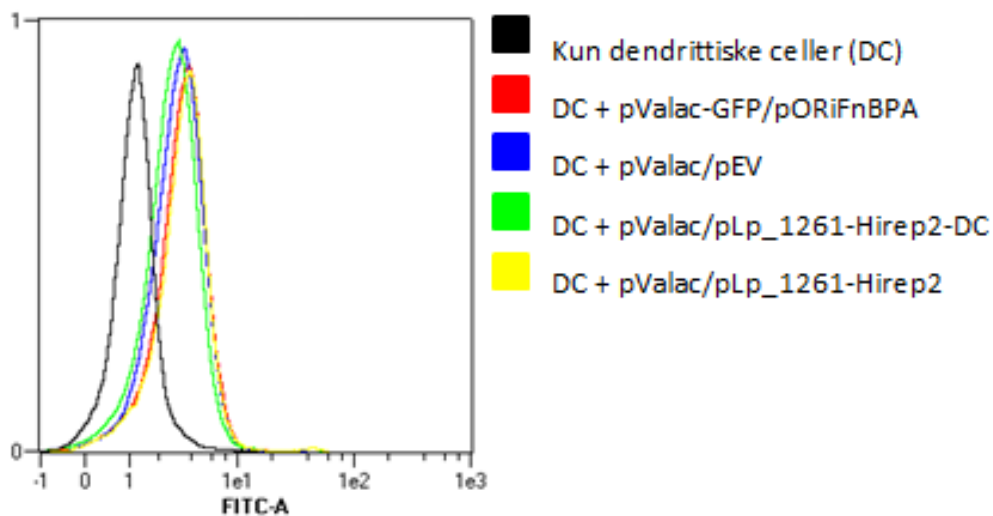
Figur 4.19. viser utviklingen av monocyttske celler til dendrittske celler. Runde celler ble observert rett etter isoleringen av CD14-positive monocytter, og Figur 4.19.A. viser et mikroskopibilde tatt 2 timer etter isoleringen hvor flertallet av cellene fortsatt var runde. Under differensieringen mot dendrittske celler ble celler med ulik morfologi observert, og gjerne med en utstrakt fasong som indikerer at de er differensiert til dendrittske celler.



**Figur 4.19. Differensieringen fra monocytter til dendrittske celler.** A) dag 0: CD14-positive monocytter 2 timer etter isolering; B) dag 3: cellene viser endret morfologi; C) dag 6: ferdig differensierte dendrittske celler.

Strømningscytometri ble benyttet for å analysere opptaket av rekombinante bakterier i dendrittske celler. Denne analysen ble utført 36 timer etter ko-inkuberingen av dendrittske celler og rekombinante *L. plantarum* (seksjon 3.19.3.). Kun dendrittske celler ble benyttet som negativ kontroll, disse cellene ble altså ikke utsatt for ko-inkubering med bakterier. Rekombinant *L. plantarum* med plasmidet pORiFnBPA (vennlig gitt av Dr. Christophe Michon) og pValac-GFP ble benyttet som en positiv kontroll i analysen. Av plasmidene konstruert i dette studiet ble bakterier med besittelse av pValac-GFP, samt pLp\_1261-Hirep2-DC eller pLp\_1261-Hirep2, inkludert i eksperimentet.

Resultatene fra strømningscytometri-analysen er presentert i Figur 4.20. Analysen gir indikasjoner på opptak av bakterier i dendrittiske celler, da fluorescenssignal fra GFP kan detekteres hos alle populasjoner med dendrittiske celler som ble ko-inkubert med rekombinante *L. plantarum*. Forskjeller i fluorescenssignal kan imidlertid ikke detekteres blant de ulike populasjonene av dendrittiske celler som ble ko-inkubert med ulike stammer av rekombinante *L. plantarum*. Metoden som ble benyttet for presenterte resultater (Figur 4.20.) ble ikke gjentatt grunnet tidsbegrensninger.



**Figur 4.20. Strømningscytometri av dendrittiske celler.** Effekten av DC-pep ble undersøkt ved ko-inkubering av rekombinante *L. plantarum* med dendrittiske celler (se tekst for detaljer). X-aksen viser intensiteten på det fluorescerende signalet. Fargekodene for de ulike konstruktene er indikert i figuren.

### 4.12. Deteksjon av rekombinante bakterier i nasale- og vaginale slimhinner

Det er planlagt et større museforsøk i samarbeid med Statens Serum Institut i København, og i den forbindelse er det ønskelig å vite hvor lenge rekombinante *L. plantarum* kan detekteres etter vaksineadministrering i nasale- og vaginale slimhinner. Som en forløper til dette forsøket ble det undersøkt hvor lenge *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC kunne detekteres etter immunisering, fordi det kan ha betydning for en eventuell immunrespons.

Musene ble delt inn i fem grupper med fem mus i hver gruppe, og fulgte immuniseringsprotokollen vist i Tabell 4.2. Musene ankom 4 uker gamle, og etter omtrent 2 uker med akklimatisering mottok musene en injeksjon med hormonet Depo-Provera for synkronisering av menstruasjonssyklusene. En gruppe med mus fungerte som negativ

kontroll, og disse musene mottok dermed ingen vaksine (Gr. 1, Tabell 4.2.). De resterende gruppene, Gr. 2-5, mottok en vaksinedose ( $1 \times 10^9$  *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC) 7 dager etter hormonbehandlingen, mens kun gruppe 3 og 5 mottok en andre vaksinedose ( $1 \times 10^9$  *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC) påfølgende dag (Tabell 4.2.).

**Tabell 4.2. Immuniseringsprotokoll for *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC.** En gruppe mus (negativ kontroll) mottok ingen vaksine. Gruppe 2 og 4 mottok kun en vaksinedose, mens gruppe 3 og 5 mottok en ekstra dose påfølgende dag.

Gruppe	Dose 1	Dose 2
1. Negativ kontroll	-	-
2. Intranasal	Ja	-
3. Intranasal boost	Ja	Ja
4. Intravaginal	Ja	-
5. Intravaginal boost	Ja	Ja

Etter immunisering ble det samlet inn vaginale- og nasale prøver (seksjon 3.20.), der prøver fra vagina ble tatt annenhver dag og nasale bakterieprøver ble tatt fra ett tilfeldig nesebor hver dag. Prøvene ble selektert frem på MRS-ager med Erytromycin (pLp\_1261-Hirep2-DC inneholder resistensgen mot Erytromycin), og koloni-PCR (seksjon 3.5.) ble utført for å undersøke om bakteriene var i besittelse av plasmidet pLp\_1261-Hirep2-DC.

I Tabell 4.3. vises resultatene over hvor lenge *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC kunne detekteres fra både nasale- og vaginale slimhinner etter immuniseringen. Fra musene i Gr. 1 (negativ kontroll) ble det samlet inn både nasale- og vaginale bakterieprøver. Hovedlinjene fra denne oversikten er at flest bakterier ble detektert etter nasal administrasjon dagen etter siste dose, og ingen bakterier ble detektert senere enn to dager etter siste vaksinedose ved denne administrasjonsruten. Ved vaginal administrasjon ble det aldri detektert mer enn en koloni etter prøvetakingen, men hos Gr. 4 (intravaginal) ble det påvist en bakteriekoloni tre dager etter vaksinedosen ble gitt (Tabell 4.3.).

**Tabell 4.3. Deteksjon av *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC intranasalt og intravaginalt etter immunisering.** Svarte ruter representerer dager hvor prøveinnsamling ikke ble gjennomført, mens strek (-) indikerer ingen bakterievekst. Antallet kolonier er registrert, men der det var flere enn 5 kolonier er det markert >5. Blå = påvisning av pLp\_1261-Hirep2-DC ved PCR; hvite ruter med tall = ikke pLp\_1261-Hirep2-DC.

Gr.	Mus	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5	Dag 6	Dag 7
<b>1-n.k</b>	1	-	-	-	-	-		
	2	(1 nasal)	-	-	-	-		
	3	(1 vaginal)	-	-	-	-		
	4	-	-	-	-	-		
	5	-	-	-	-	-		
<b>2-i.n</b>	1	-	-	1	-	1		-
	2	>5	-	-	2	1		3
	3	>5	-	-	2	-		-
	4	>5	-	>5	>5	>5		1
	5	>5	-	-	>5	-		-
<b>3-i.n.b</b>	1		>5	1	-	-		-
	2		>5	-	1	-		-
	3		>5	1	>5	-		-
	4		-	-	>5	-		-
	5		>5	1	-	-		1
<b>4-i.v</b>	1	-		-		1		-
	2	-		>5		3		-
	3	(1)		-		-		-
	4	>5		1		1		-
	5	>5		-		2		-
<b>5-i.v.b</b>	1		-		-			-
	2		-		-			-
	3		-		-			-
	4		-		-			-
	5		1		-			-

Forkortelser: n.k = negativ kontroll; i.n = intranasal; i.n.b = intranasal boost; i.v = intravaginal; i.v.b = intravaginal boost.

## 5. DISKUSJON

### 5.1. Antigener og konstruksjon av plasmider

Tidligere forsøk, som beskrevet i seksjon 1.9., har vist at Hirep1 og Hirep2 kan gi god beskyttelse mot genital klamydiainfeksjon i dyremodeller (Olsen et al. 2015). Dette gjør en vaksine med utgangspunkt i disse antigenene svært lovende. Disse antigenene ble derfor benyttet i denne oppgaven hvor det ble laget rekombinante *Lactobacillus plantarum* med antigenene Hirep1 og Hirep2 ankret til celleoverflaten. Tanken er at *L. plantarum* med *Chlamydia trachomatis* antigener på overflaten kan indusere en beskyttende immunrespons og, som et langsiktig mål, benyttes som en vaksine mot genital klamydiainfeksjon. *L. plantarum* benyttes da som en leveringsvektor for antigenene. Ankring, og ikke sekresjon eller intracellulær lokalisering av antigenene, ble benyttet som strategi. Dette fordi slimhinneoverflatene utsetter vaksineantigenene for flere ulike utfordringer (seksjon 1.6.). Overflateankring kan derfor være en måte å presentere antigenene til immuncellene på, samtidig som antigenene delvis beskyttes av bakterienes cellevegg. For og forsøke å øke interaksjonen mellom de overflateankrede antigenene og immuncellene, kan man benytte strategier for å rette antigenene direkte til spesifikke immunceller. Et eksempel er et dendrittisk cellebindende peptid (DC-pep) som er kjent for å binde dendrittiske celler fra både mus og mennesker (Curiel et al. 2004). Det har blitt vist at DC-pep koblet til et beskyttende antigen fra *Bacillus anthracis* induserte en sterk beskyttende immunrespons hos mus sammenliknet med antigen uten DC-pep (Mohamadzadeh et al. 2009). På bakgrunn av dette ble DC-pep koblet til antigenene Hirep1 og Hirep2 der ideen er at dette peptidet skal kunne øke (1) interaksjonen med dendrittiske celler, (2) internaliseringen av fusjonsproduktet, og (3) den påfølgende immunresponsen.

Modifisering av *L. plantarum* for å uttrykke antigenene Hirep1 og Hirep2 på celleoverflaten, ble utført ved å translasjonelt fusjonere antigenene med sekvenser som vil ankre antigenet til celleveggen eller cellemembranen. Versjoner av membran- og celleveggankring av antigenene inkluderte translasjonell kobling til DC-pep. For mest mulig eksponering av DC-pep mot omgivelsene, og dermed økt sjans for interaksjon med dendrittiske celler, var sekvensen til DC-pep N-terminalt ved celleveggankring og C-terminalt ved lipoproteinankring. Oversikt over alle konstruerte plasmider i dette studiet er gitt i Tabell 4.1.

## 5.2. Veksten til rekombinante *L. plantarum*

Sekresjon av heterologe proteiner kan medføre sekresjonsstress hos bakterier (Bolhuis et al. 1999). Stressreaksjonen kan utarte seg som redusert vekst hos bakterien, og tidligere forsøk der melkesyrebakterier har blitt genmodifisert til å sekretere heterologe genprodukter ved hjelp av pSIP-vektorer, har vist slik vekstredusering (Fredriksen et al. 2012; Solberg 2015; Tjøland 2011; Urdal 2013; Øverland 2013). Dette studiet viser den samme trenden, der alle de konstruerte plasmidene (Tabell 4.1.) medførte redusert vekst hos *L. plantarum*, sammenliknet med *L. plantarum* med pEV (Figur 4.5.). Veksten ble påvirket i minst grad hos *L. plantarum* som ble indusert til å sekretere og ankre antigenene via lipoprotein-ankre, mens veksten ble kraftig redusert hos *L. plantarum* som ble modifisert til å ankre genproduktene til celleveggen (Figur 4.5.). De ulike variantene av *C. trachomatis* antigenene (Hirep1 og Hirep2, med og uten DC-pep), tydet ikke på å ha innvirkning på veksten. Resultatene indikerer dermed at selve ankringsmekanismen har betydning for vekstraten i dette tilfellet. Hos *L. plantarum* med vektorer for celleveggankring av antigenene observeres det vekst, men den er veldig liten. I Vedlegg, Figur V-1 kommer det tydelig frem at veksten for det meste foregår den første timen etter indusering, for deretter å flate ut.

To-tre timer etter indusering klarte ikke *L. plantarum* med lipoprotein-ankring av antigenene å holde følge med vekstraten som ble observert hos *L. plantarum* med pEV (Figur 4.5.). Liknende resultater ble funnet av Øverland (2013), der veksten hos *L. plantarum* med ankring av et tuberkulose-antigen til både cellemembranen og celleveggen viste samme trend i vekst som i dette studiet. Studiene viser også overensstemmelse vedrørende DC-pep; det 12 aminosyrer-lange peptidet har ikke betydning for veksten da antigenene med og uten DC-pep viser samme vekstrate.

## 5.3. Analyse av antigenproduksjon ved Western blot

Produksjon av målgenene, antigenene Hirep1 og Hirep2, med og uten DC-pep, ble først analysert ved Western blot. Analysen ble utført på cellefritt proteinekstrakt, og resultatene viser at induserbar produksjon av antigenene var vellykket hos alle de rekombinante bakteriene (Figur 4.6. og 4.7.). Analysen av proteinekstrakt fra *L. plantarum* med plasmider for ankring av antigenene til cellemembranen (Figur 4.6.) viste produksjon av proteiner som stemte bra overens med beregnet molekylmasse. Resultatene fra analysen av bakteriene med plasmider for ankring av antigenene til celleveggen viste derimot avvik fra beregnet teoretisk

molekylmasse, da disse båndene etter Western blot-analysen var omtrent 20-30 kDa større enn beregnet (Figur 4.7.). Dette fenomenet, der proteiner som ankres til celleveggen ved hjelp av et C-terminal LPXTG-liknende motiv, og som viser større molekulmasse enn forventet ved Western blot-analyser, har blitt observert i andre studier (Fredriksen et al. 2010; Solberg 2015). Fredriksen et al. (2010) ankret et onkoføtalt antigen («oncofetal antigen», OFA) til overflaten av *L. plantarum* ved hjelp av celleveggankre, der formålet var at den rekombinante bakterien kunne benyttes som slimhinnevaksine mot kreft. Western blot-analyser av celleveggfraksjonen fra *L. plantarum* med celleveggankret OFA, viste et bånd som var omtrent dobbelt så stort i forhold til hva som var forventet. En mulig forklaring var dimerisering av OFA-proteinet, da dette proteinet var kjent for å ha en tendens til å danne dimere. I en annen studie av Piard et al. (1997) ble M6-proteinet fra *Streptococcus pyogenes* ankret på overflaten av ulike melkesyrebakterier via celleveggen. De observerte at celleveggankret M6-protein hadde høyere molekulmasse enn rensert M6-protein fra *E. coli*, hvor proteinet ikke var ankret til overflaten. De konkluderte med at fragmenter fra celleveggen bidro til den økte molekulmassen hos ekstrakter fra celleveggankret M6-protein. Hva gjelder Hirep-antigenene, er ingen tendens for naturlig dimerisering foreløpig kjent, og en eventuell dimerisering har i så fall kun skjedd ved celleveggankring av antigenene da størrelsen på antigenene er omtrent som forventet ved lipoprotein-ankring. At fragmenter fra celleveggen medfører den økte molekulmassen er dermed kanskje mer sannsynlig.

Ved de første Western blot-analysene (Vedlegg, Figur V-2.) ble det observert bakgrunn med uspesifikke bindinger av primærantistoffet og muligens nedbrytningsprodukter. Det ble forsøkt å benytte tørrmelk i blokkeringsløsningen for å undersøke om eventuelle uspesifikke bindinger kunne elimineres. I Figur V-2.C. observeres det at noen av de svake båndene som ligger over Hirep-antigenene har forsvunnet, så en liten forbedring ble registrert. Det er likevel betydelig bakgrunn, selv med denne forbedringen. Western blottene vist i Figur 4.6. og 4.7. viser derimot lite bakgrunn, og her ble antistoffmengden endret, det ble benyttet proteasehemmer, samt at blokkeringsløsningen inneholdt tørrmelk. Ved bare å se på disse blottene er det vanskelig å avgjøre om det er proteasehemmeren eller den endrede mengden antistoff (mindre primærantistoff og mer sekundærantistoff, seksjon 3.15.3.) som gir mindre bakgrunn. Figur 4.12. viser Western blottet som ble benyttet til estimering av mengde antigen i en gitt mengde bakterier. Her ble det imidlertid ikke benyttet proteasehemmer, og antistoffhybridiseringen ble utført ved SNAP i.d.® immundeteksjon med BSA i blokkeringsløsningen (seksjon 3.15.2.). Den justerte mengden med antistoffer ble for øvrig

benyttet også i dette tilfellet. Dette kan være en indikasjon på at bakgrunnen som observeres i Figur V-2. i hovedsak skyldtes uspesifikk binding av primærantistoffet grunnet for høy konsentrasjon.

Vellykket produksjon av målproteiner ble som nevnt over registrert i alle de rekombinante *L. plantarum*-stammene som ble konstruert i dette studiet (Tabell 4.1.). Det ble ikke observert noen tydelige forskjeller mellom antigenene Hirep1 og Hirep2, eller mellom antigenene med og uten DC-pep. Hos stammene for celleveggankring av antigenene observeres det en liten forskjell i intensiteten på båndene mellom DC-Hirep2/Hirep2 og DC-Hirep1/Hirep1 (Figur 4.7.), noe som kan indikere at produksjonen av DC-Hirep1/Hirep1 er litt høyere enn produksjonen av DC-Hirep2/Hirep2. Hos stammene for membranankring av antigenene ser alle stammene ut til å produsere omtrent lik mengde protein. Det mest fremtredende ved disse analysene var den økte molekylmassen – i forhold til hva som var forventet, hos bakteriene med plasmider for celleveggankring av antigenene.

### **5.4. Deteksjon av overflateankrede antigener**

Antigenene ble ligert/klonet inn i vektorer for ankring til bakteriens cellemembran og cellevegg. For å undersøke om sekresjonen og påfølgende ankring av antigenene hadde funnet sted, ble induserte, rekombinante *L. plantarum* analysert med strømningscytometri og konfokal laserskanning-mikroskopi. Bakteriene ble farget med FITC før analysene (seksjon 3.17.1.), og relativ fluorescens fra FITC ble registrert. Resultatene fra strømningscytometri og konfokal laserskanning-mikroskopi er henholdsvis vist i Figur 4.9. og 4.10., og alle de rekombinante bakteriene konstruert i dette studiet (Tabell 4.1.) viste FITC-fargede celler. Forskyving av histogrammene til høyre indikerer fluorescerende signal fra FITC, og denne forskyvningen observeres hos alle *L. plantarum* modifisert for ankring av Hirep-antigenene til celleoverflaten (Figur 4.9). *L. plantarum* med pEV gav ingen fluorescerende signal, hvilket betyr at hverken primær- eller sekundærantistoffet har bundet uspesifikt til andre overflatelokalisererte proteiner. Som en ekstra kontroll ble *L. plantarum* med pLp\_1261-Ag85B-E6-DC (Øverland 2013) også inkludert i strømningscytometri-analysen (Vedlegg, Figur V-3.). Det er et plasmid for ankring av et tuberkuloseantigen fusjonert til DC-pep via lipoproteinet Lp\_1261. Det ble ikke detektert noe fluorescens etter FITC-farging av denne kontrollen, og det betyr at hverken primær- eller sekundærantistoffet med FITC binder til selve lipoprotein-ankeret. En tredje kontroll kunne blitt inkludert, da et konstrukt hvor



celleveggankeret cwa2 var fusjonert til et annet antigen enn Hirep-antigenene. Dette ville vist om primær- eller sekundærantistoffet binder til selve celleveggankeret eller ikke. En slik kontroll ble ikke inkludert i dette studiet, men basert på de overnevnte kontrollene ser antistoffene ut til å binde spesifikt. Bakgrunnen i de første Western blot-analysene (Vedlegg, Figur V-2.) ble ovenfor konkludert til å være forårsaket av uspesifikk binding av primærantistoffet grunnet for høy konsentrasjon (seksjon 5.3.). Problemer med uspesifikk binding grunnet en eventuell for høy konsentrasjon av antistoff forårsaket ikke problemer i disse analysene, i og med at *L. plantarum* med både pEV og pLp\_1261-Ag85B-E6-DC ikke avga fluorescens.

I resultatene i Figur 4.9. og 4.10. vises sterkest fluorescerende signal hos *L. plantarum* med celleveggankring av Hirep2, med og uten DC-pep. I Vedlegg, Figur V-3 observeres ikke den samme trenden som i Figur 4.9. I Figur V-3 vises omtrent lik intensitet på det fluorescerende signalet hos alle de rekombinante *L. plantarum* med Hirep-antigenene. Dette kan skyldes tekniske feilkilder vedrørende fargingen med FITC. For eksempel er det tenkelig at for stor cellepopulasjon kan medføre at noen av cellene ikke blir farget.

Ved konfokal laserskanning-mikroskopi observeres det fluorescerende signalet fra FITC generelt lettere ved celleveggankrede antigener enn ved lipoprotein-ankrede antigener (Figur 4.10.). En mulig forklaring kan være at antigenene blir delvis dekket til av celleveggen ved ankring til membranen. Strømningscytometri er en mer sensitiv metode for å registrere fluorescens, og det kan forklare hvorfor denne forskjellen ikke observeres her. En fordel med konfokal laserskanning-mikroskopi er at antigenenes fordeling/plassering på celleoverflaten kan studeres. Fredriksen et al. (2012) observerte at N-terminal ankring av invasin fra *Yersinia pseudotuberculosis* på overflaten av *L. plantarum*, deriblant ankring ved hjelp av anker hentet fra genet Lp\_1261, viste distinkte lokaliseringsmønstre på celleoverflaten. Det fluorescerende signalet ved konfokal laserskanning-mikroskopi ble observert sterkest ved septum eller at det var konsentrert i ulike punkter på overflaten. Liknende lokaliseringsmønstre kunne imidlertid ikke observeres i dette studiet (Figur 4.10.).

### 5.5. Estimering av antigenkonsentrasjon i en gitt bakteriepopulasjon

Det er planlagt et større museforsøk i samarbeid med Statens Serum Institut i København, der *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC skal benyttes som en booster-vaksine som administreres nasalt, etter at immunsystemet har blitt «primet» med en subkutan injeksjon av Hirep2. Til dette formålet er det viktig å ha et estimat av mengden antigen (Hirep2-DC) i en gitt mengde bakterier. Det ble dermed utført en semi-kvantitativ Western blot-analyse av cellelysat fra  $1 \times 10^9$  bakterier (Figur 4.12. og 4.13. og Vedlegg, Tabell V-2 og V-3.). I forkant av dette forsøket ble det testet ulike metoder for å lysere bakteriene. Det er viktig at bakteriene blir fullstendig lysert slik at estimatet blir best mulig. Slik det fremkommer i seksjon 4.8., ble det besluttet at behandling av bakteriene med lysozym og mutanolysin, samt at supernatanten måtte inkluderes i analysen, var den beste metoden for fremskaffelse av totalt cellelysat (henholdsvis Vedlegg, Figur V-4 og Figur V-5.). Resultater fra tre ulike kulturer viste et gjennomsnitt på 6,9  $\mu\text{g}$  Hirep2-DC i  $1 \times 10^9$  bakterier. Disse resultatene er et estimat på den totale mengden antigen, det vil si både intracellulært og membranankret antigen. Under interaksjon med immunforsvarets celler vil overflateankret antigen være tilgjengelig, men også intracellulært lokalisert antigen antas å være av betydning ettersom dette vil bli frigitt etter at bakteriene blir tatt opp av immuncellene.

Det er flere årsaker til at denne analysen kun gir et semi-kvantitativt estimat på mengden antigen, der noen av grunnene er: (1) lang prosedyre med mange ulike trinn som øker sannsynligheten for feilkilder (2) eksakt mengde bakterier er ikke mulig å verifisere, (3) heterogen løsning av cellelysat, (4) påvirkning av forhold vedrørende blottingen, (5) konsentrasjon av antistoffer, (6) kamerasensitivitet og eksponeringstid, og (7) definering av bånd for tillaging av standardkurve (Heidebrecht et al. 2009). Metoden gir likevel et innblikk i hvor konsentrasjonsområdet for antigenet ligger.

Informasjon om antigenmengden muliggjør forsøk der man kan finne optimal dose for best mulig vaksineeffekt. I denne analysen ble det besluttet å estimere mengden antigen i  $1 \times 10^9$  bakterier fordi det er denne mengden som er planlagt å gi i museforsøket, men denne mengden må kanskje revurderes. Olsen et al. (2015) gav en subkutan injeksjon som inneholdt 5  $\mu\text{g}$  antigen. Selv om den mengden fungerte bra ved subkutan injeksjon, er det nødvendigvis ikke direkte sammenliknbart med slimhinnevaksinering. Det beste ville derfor vært å gjennomføre forsøk for å finne en optimal dose ved slimhinnevaksinasjon.

## 5.6. Lagring av induerte rekombinante *L. plantarum*

Hvis rekombinante *L. plantarum* i fremtiden skal benyttes som vaksine mot klamydia, eller andre sykdommer, er det nødvendig med en egnet oppbevaring av bakteriene. Oppbevaringen bør ideelt sett bevare bakteriens levedyktighet, samt at antigenene forblir intakte (ikke nedbrutt) og lokalisert der de er ment (for eksempel ankret til celleoverflaten). Frysetørking er en metode som kan tillate oppbevaring av bakteriene ved romtemperatur. I dette studiet ble levedyktigheten til *L. plantarum* med plasmider for lipoprotein-ankring av antigener, samt *L. plantarum* med pEV, testet før og etter en frysetørkingsprosess. Etter frysetørkingen ble levedyktigheten registrert på dag 5, 18 og 43. Resultatene viser at levedyktigheten går ned over tid (Figur 4.14.), og på dag 43 var overlevelsesprosenten mellom 5-11 % av hva den var før frysetørkingsprosessen startet. Selv om dødeligheten er stor etter 43 dager, er det fortsatt en stor mengde levende bakterier på dette tidspunktet – omtrent  $1 \times 10^8$  CFU/ml. Øverland (2013) utførte et liknende eksperiment der levedyktigheten til induerte, rekombinante *L. plantarum* med tuberkuloseantigener ble testet etter frysetørking. Der viste *L. plantarum* med pEV høyest overlevelsesprosent etter to måneder (68 %) sammenliknet med de andre konstruktene (5-25 %). I dette studiet ble det, overraskende nok, registrert lavest overlevelsesprosent hos *L. plantarum* med pEV. Den samme trenden ble observert i et forsøk der levedyktigheten ble registrert under korttidslagring av induerte, rekombinante *L. plantarum*, der bakteriene ble oppbevart ved 4 °C i kjøleskap i ett døgn og deretter i isoporboks med kjøleelementer de neste døgnene. Resultatene viste tydelig at overlevelsen til *L. plantarum* med pEV var lavest sammenliknet med *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC (Figur 4.16.). En mulig forklaring kan være at bakteriene som ble modifisert for å sekretere og ankre antigener på overflaten (Tabell 4.1.) ble utsatt for stress ved induering av proteinproduksjon, noe som også samsvarer med vekstkurvene (Figur 4.5.). Dette kan ha medført at de var mer tolerante ovenfor andre påfølgende stressmomenter, som frysetørking. Tidligere forskning har avslørt et fenomen der utsettelse for subletalt stress hos bakterier kan medføre bedre motstandsdyktighet mot nye stressfaktorer (Desmond et al. 2001; Desmond et al. 2004; Prasad et al. 2003). Zotta et al. (2012) demonstrerte at *L. plantarum* WCFS1 fikk forbedret stresstoleranse etter vekst under aerobiske forhold (steril luft ble «spylt» ned i fermentoren). Det hadde vært interessant å undersøke om overlevelsesprosenten kunne blitt forbedret etter frysetørkingsprosessen ved å dyrke bakteriene under aerobiske forhold, samt og se hvordan det hadde påvirket levedyktigheten til *L. plantarum* med pEV.

Antigenene var fortsatt lokalisert på overflaten av bakteriene både etter frysetørkingsprosessen (Figur 4.15.) og under korttidslagringen (Figur 4.17.). Korttidslagringen av bakteriepellet av *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC avslørte heller ingen synlig nedbrytning av antigenet (Figur 4.18.). Som nevnt innledningsvis i denne seksjonen, bør oppbevaringen av rekombinante *L. plantarum* ideelt sett ikke påvirke antigenene og deres lokalisasjon hvis de i fremtiden skal bli benyttet som vaksine, da intakte antigener kan være av betydning for vaksineeffekten.

### 5.7. Opptak av rekombinante *L. plantarum* i dendrittske celler

DC-pep ble fusjonert til antigenene for og potensielt kunne øke interaksjonen med, og opptak i, dendrittske celler. For å undersøke om DC-pep førte til økt opptak i dendrittske celler, ble de konstruerte plasmidene (Tabell 4.1.) transformert i *L. plantarum* med plasmidet pValac-GFP (Guimarães et al. 2009). Dette plasmidet inneholder genet for GFP, og genet kontrolleres av en cytomegalovirus promotor som gjenkjennes i eukaryotiske celler. Ved opptak i dendrittske celler vil bakteriene bli lysert, dermed blir promotoren oppstrøms for GFP tilgjengelig for den dendrittske cellens transkripsjon- og translasjonsmaskineri. Dette medfører at GFP kun blir uttrykt etter internaliseringen av bakterien som bærer plasmidet pValac-GFP. Denne prosessen ble utnyttet for å følge opptaket av rekombinante *L. plantarum* med og uten DC-pep. Rekombinante bakterier med plasmid for ankring av antigenet Hirep2 til overflaten og plasmidet pValac-GFP ble ko-inkubert med dendrittske celler. Fluorescens fra GFP ble analysert ved strømningscytometri, og resultatene viser opptak av alle de rekombinante bakteriene i dendrittske celler (Figur 4.20.). Det kunne imidlertid ikke påvises økt opptak av bakterier med DC-pep fusjonert til Hirep2-antigenet, da forskjeller i fluorescenssignalet ikke kunne detekteres.

Øverland (2013) benyttet et gentamicin-assay (assayet baserte seg på å lysere de dendrittske cellene og plate internaliserte bakterier) til å teste effekten av DC-pep for opptak av rekombinante *L. plantarum* i dendrittske celler. Ulike lengder på ko-inkubering av dendrittske celler og rekombinante bakterier ble testet for å avgjøre hvilken inkuberingslengde som viste størst forskjeller mellom bakterier med og uten DC-pep. Forskjell i opptak var tydeligst etter en time, og det ble fremsatt en hypotese om at lengre inkuberingslengde ville kunne maskere forskjellene i opptak grunnet nedbrytning av internaliserte bakterier. Samme hypotese kan ikke videreføres til dette forsøket, men det er tenkelig at

forskjellen i opptak vil være tydeligst i kort tid etter ko-inkuberingen, da de dendrittiske cellene er fagocytterende og vil internalisere bakteriene uansett tilstedeværelse av DC-pep eller ikke. Det ville derfor ha vært interessant og testet en kortere inkuberingstid enn 2 timer for de dendrittiske cellene og rekombinante bakteriene.

Christophe et al. (2015) benyttet omtrent samme metode som i dette studiet for påvisning av økt opptak av *L. plantarum* med overflateankret anti-DEC-205 i dendrittiske celler. Anti-DEC-205 var rettet mot reseptoren DEC-205 som finnes på overflaten av dendrittiske celler. Deres forsøk viste et interessant funn; nemlig at celleveggankret anti-DEC-205 viste størst opptak *in vitro*, mens anti-DEC-205 ankret til cellemembranen var best i *in vivo* forsøk. I dette studiet ble kun Hirep2-antigenet (med og uten DC-pep) ankret til cellemembranen inkludert i forsøket. Ved gjentakelse av forsøket ville det derfor vært aktuelt å inkludere også celleveggankret antigen med og uten DC-pep for å undersøke om overnevnte tilfelle er gjeldene for konstruktene med *C. trachomatis* antigener også.

I forkant av forsøket som representerer resultatene vist i seksjon 4.11., ble 1 mM Tris-HCl pH 8 (og ikke 1 M) benyttet som buffer til å suspendere de rekombinante *L. plantarum* i (resultater ikke vist). Det oppstod problemer med at de dendrittiske cellene løsnet fra vevskulturplaten, og dermed ikke kunne analyseres. Cellene kan ha blitt påvirket av for lav pH etter tilsetning av melkesyrebakteriene. Videre ble det forsøkt å resuspendere bakteriene i RPMI med 20 mM HEPES. Da ble det observert at de dendrittiske cellene så ut til å være «dekket av hår». En mulig forklaring er at serumet i mediet (RPMI) gjorde at bakteriene med overflateankret protein bandt til den ekstracellulære matriksen. Til slutt ble det forsøkt å benytte 1 M Tris-HCl pH 8 (høyere konsentrasjon for stabilisering av pH), og dette syntes å fungere bedre (ble benyttet ved representerte resultater). Gjentakende forsøk ble ikke gjennomført grunnet tidsbegrensninger, men overnevnte endringer ville vært aktuelle ved nye forsøk.

### **5.8. Deteksjon av rekombinante bakterier i nasale- og vaginale slimhinner**

Som nevnt er det planlagt et større museforsøk i samarbeid med Statens Serum Institut i København, der *L. plantarum* med Hirep2-DC ankret til cellemembranen via lipoproteinet Lp\_1261, skal administreres nasalt og vaginalt. I forbindelse med dette ble det i forkant undersøkt hvor lenge *L. plantarum* kunne detekteres i nasale og vaginale slimhinner etter

administrering. Dette fordi tidsrommet den rekombinante bakterien er til stede *in vivo* kan være av betydning for immunresponsen. Som nevnt i seksjon 1.7. vil lengre eksponeringstid av antigenene til immunforsvaret potensielt øke sjansene for stimulering av en immunrespons.

Dagen etter siste administrering med bakterier (boost-gruppene fikk to doser, Tabell 4.2.) ble det samlet inn vaginale og nasale prøver (seksjon 3.20. for detaljer). Resultatene viste deteksjon av flest *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC etter nasal administrering (Tabell 4.3.). Dagen etter siste administrering ved denne ruten ble det registrert >5 kolonier hos fire av fem mus i Gr. 2 og Gr.3 (intranasal og intranasal boost, Tabell 4.2.). Ved vaginal administrasjonsrute ble det kun observert en koloni med *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC hos en mus i Gr. 4 og hos en mus i Gr. 5 (Tabell 4.3.). Dette gir indikasjoner på svært dårlig overlevelse ved denne administrasjonsruten. Ved nasal administrasjon gir resultatene indikasjon på god overlevelse av *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC frem til ett døgn etter siste vaksinedose ble gitt.

Deteksjonen av rekombinante *L. plantarum* i nasale slimhinner kan ikke sammenliknes direkte med resultatene fra de vaginale slimhinnene. Dette fordi prøvetakingen ble utført på forskjellige måter, der ingen av dem representerer en kvantitativ metode. Nasale prøver ble anskaffet ved neseskylling med PBS, mens vaginale prøver ble samlet inn ved bruk av en inokuleringspinne (seksjon 3.20.). Neseskyllingen kan ha medført at «alle» bakteriene ble skylt ut ved første prøvetaking, noe som kan stemme overens med resultatene (Tabell 4.3.). Videre kan bruk av inokuleringspinnen i vagina ha medført at bakterier ikke ble «fanget opp». På den annen side kan det være at den korte overlevelseslengden er forårsaket av at de rekombinante bakteriene ble tatt opp av immunforsvarets celler raskt etter administrering. Det er ikke mulig å stadfeste en gitt overlevelseslengde i nasale og vaginale slimhinner basert på disse resultatene, men forsøket gir likevel en indikasjon på at overlevelsen ikke er særlig langvarig.

Musene i dette forsøket fikk hormonet Depo-Provera for synkronisering av menstruasjonssyklusen. En interessant observasjon indikerer at *L. plantarum* kan påvises i større mengder (ved samme prøveinnsamlingsmetode), etter administrering via vaginal rute, hos mus som ikke ble behandlet med hormon for synkronisering av menstruasjonssyklusen (data ikke vist, personlig kommunikasjon med Katarzyna Kuczkowska, 2016). Indusering av ovulasjon med det kvinnelige kjønnshormonet østradiol har hos mus blitt demonstrert å hindre

antigenpresenterende celler i opptak av antigener, som videre hemmer den adaptive immunresponsen (Seavey & Mosmann 2009). Videre har det blitt påpekt at kolonisering av *Lactobacillus jensenii*, for levering av et HIV-hemmende protein i vaginale slimhinner, var avhengig av østradiol-behandling (Liu et al. 2006). Dermed er det mulig at østradiol favoriserer vaginal kolonisering i motsetning til Depo-Provera, men østradiol gagnar ikke responsene som er nødvendig for immunisering. Videre kan det stilles spørsmål ved om det er nødvendig med synkronisering. Som nevnt i seksjon 1.6., har utvikling av immunrespons mot noen antigener indikert å være avhengig av menstruasjonssyklusens stadier (Kozlowski et al. 2002). For å få sammenliknbare resultater mellom musene i ulike grupper ved vaksinasjonsstudier, kan det derfor å være nødvendig med synkroniserte mus. Ideelt sett bør det testes for bakterieoverlevelse og immunrespons i ulike deler av menstruasjonssyklusen. Da vil man finne ut om og eventuelt når i syklusen en vaginal slimhinnevaksine gir best effekt.

## 5.9. Konklusjoner og fremtidige perspektiver

Dette studiet demonstrer vellykket ankring av *C. trachomatis* antigener på overflaten av *L. plantarum*. Produksjon av antigenene ble bekreftet ved Western blot-analyser, og overflatelokaliserings ble stadfestet ved strømningscytometri og konfokal laserskanning-mikroskopi.

Studiet inkluderte flere eksperimenter som ble gjennomført med tanke på et større museforsøk som skal gjennomføres i samarbeid med Statens Serum Institut i København, da inkludert (1) korttidslagring for simulering av forsendelse av bakterier, (2) estimering av antigenkonsentrasjon i en gitt mengde bakterier, og (3) museforsøk med vaginal og nasal administrering av rekombinant *L. plantarum* for avdekking av bakteriens overlevelseslengde. *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC (membranankret) ble vurdert til å være beste kandidat for museforsøket. Dette bygger blant annet på fremsatt hypotese om at (1) Hirep2 vil gi beskyttelse mot *C. trachomatis* serotype D, E, F og G – som representerer de mest utbredte serotypene som forårsaker genital infeksjon hos mennesker (Lysén et al. 2004; Machado et al. 2011; Mossman et al. 2008), og at (2) DC-pep vil kunne øke opptaket av rekombinant *L. plantarum* i dendritiske celler og dermed potensielt kunne bidra til å forsterke immunresponsen. Sistnevnte ble undersøkt ved *in vitro*-forsøk, men kunne ikke underbygges i dette studiet. Tidligere forskning har imidlertid vist at overflateankrede proteiner rettet mot

dendritiske celler kan øke opptaket av bakterien (Christophe et al. 2015; Mohamadzadeh et al. 2009; Øverland 2013). *L. plantarum* med ankring av antigenet til cellemembranen ble valgt fremfor celleveggankring av antigenet, da Christophe et al. (2015) har vist at internalisering av cellemembranankret antigen rettet mot dendritiske celler var mer effektivt *in vivo* enn ved celleveggankret antigen. Øverland (2013) fant at *L. plantarum* med pLp\_1261-Ag85B-E6-DC, tilsvarende pLp\_1261-Hirep2-DC, men med tuberkuloseantigen, fremprovoserte sterkest immunrespons hos mus sammenliknet med celleveggankring av det samme antigenet.

Med grunnlag i resultater der Hirep-baserte antigen har gitt beskyttelse mot *C. trachomatis* infeksjon hos mus (Olsen et al. 2015), er utsiktene gode for en fremtidig vaksine mot genital klamydiainfeksjon. I første omgang skal det undersøkes om *L. plantarum* med membranankret Hirep2-DC kan booste effekten av en subkutan injeksjon av Hirep2. Om en sterk immunrespons observeres, vil mer omfattende forskning på, og modifikasjoner (som fjerning av Erytromycin resistensgenet) hos *L. plantarum* måtte gjennomføres før kliniske forsøk kan starte. En vaksine der *L. plantarum* benyttes som leveringsvektor for klamydia-antigener er fortsatt langt frem i tid (men utsiktene er gode).



## 6. REFERANSER

- Ahrné, S., Nobaek, S., Jeppsson, B., Adlerberth, I., Wold, A. E. & Molin, G. (1998). The normal Lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa. *Journal of applied microbiology*, 85 (1): 88-94.
- Aukrust, T. & Blom, H. (1992). Transformation of Lactobacillus strains used in meat and vegetable fermentations. *Food Research International*, 25 (4): 253-261.
- Baehr, W., Zhang, Y.-X., Joseph, T., Su, H., Nano, F. E., Everett, K. & Caldwell, H. D. (1988). Mapping antigenic domains expressed by Chlamydia trachomatis major outer membrane protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85 (11): 4000-4004.
- Bermúdez-Humarán, L. G., Cortes-Perez, N. G., Le Loir, Y., Alcocer-González, J. M., Tamez-Guerra, R. S., de Oca-Luna, R. M. & Langella, P. (2004). An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in mice after nasal administration with recombinant lactococci. *Journal of medical microbiology*, 53 (5): 427-433.
- Bermúdez-Humarán, L. G., Kharrat, P., Chatel, J.-M. & Langella, P. (2011). Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microbial cell factories*, 10 (1): 1.
- Boekhorst, J., Wels, M., Kleerebezem, M. & Siezen, R. J. (2006). The predicted secretome of Lactobacillus plantarum WCFS1 sheds light on interactions with its environment. *Microbiology*, 152 (11): 3175-3183.
- Bolhuis, A., Tjalsma, H., Smith, H. E., de Jong, A., Meima, R., Venema, G., Bron, S. & van Dijl, J. M. (1999). Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in Bacillus subtilis. *Applied and environmental microbiology*, 65 (7): 2934-2941.
- Bosma, T., Kanninga, R., Neef, J., Audouy, S. A., van Roosmalen, M. L., Steen, A., Buist, G., Kok, J., Kuipers, O. P. & Robillard, G. (2006). Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 72 (1): 880-889.
- Braat, H., Rottiers, P., Hommes, D. W., Huyghebaert, N., Remaut, E., Remon, J. P., van Deventer, S. J., Neiryneck, S., Peppelenbosch, M. P. & Steidler, L. (2006). A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 4 (6): 754-759.
- Brunham, R. C. & Rey-Ladino, J. (2005). Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine. *Nature Reviews Immunology*, 5 (2): 149-161.
- Brurberg, M. B., Nes, I. F. & Eijsink, V. G. (1997). Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in Lactobacillus. *Molecular microbiology*, 26 (2): 347-360.
- Buist, G., Steen, A., Kok, J. & Kuipers, O. P. (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido) glycans. *Molecular microbiology*, 68 (4): 838-847.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. & Gibbs, P. (2002). Survival of freeze-dried Lactobacillus plantarum and Lactobacillus rhamnosus during storage in the presence of protectants. *Biotechnology letters*, 24 (19): 1587-1591.
- Choy, E., Scott, D., Kingsley, G., Thomas, S., Murphy, A., Staines, N. & Panayi, G. (2001). Control of rheumatoid arthritis by oral tolerance. *Arthritis & Rheumatism*, 44 (9): 1993-1997.
- Christophe, M., Kuczkowska, K., Langella, P., Eijsink, V. G., Mathiesen, G. & Chatel, J.-M. (2015). Surface display of an anti-DEC-205 single chain Fv fragment in Lactobacillus

- plantarum increases internalization and plasmid transfer to dendritic cells in vitro and in vivo. *Microbial cell factories*, 14 (1): 95.
- Çuburu, N., Kweon, M.-N., Song, J.-H., Hervouet, C., Luci, C., Sun, J.-B., Hofman, P., Holmgren, J., Anjuère, F. & Czerkinsky, C. (2007). Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine*, 25 (51): 8598-8610.
- Cunningham-Rundles, S., Ahrné, S., Bengmark, S., Johann-Liang, R., Marshall, F., Metakis, L., Califano, C., Dunn, A.-M., Grasse, C. & Hinds, G. (2000). Probiotics and immune response. *The American journal of gastroenterology*, 95 (1): S22-S25.
- Curiel, T. J., Morris, C., Brumlik, M., Landry, S. J., Finstad, K., Nelson, A., Joshi, V., Hawkins, C., Alarez, X. & Lackner, A. (2004). Peptides identified through phage display direct immunogenic antigen to dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 172 (12): 7425-7431.
- Czerkinsky, C. & Holmgren, J. (2010). Mucosal delivery routes for optimal immunization: targeting immunity to the right tissues. I: *Mucosal Vaccines*, s. 1-18: Springer.
- Daniel, C., Roussel, Y., Kleerebezem, M. & Pot, B. (2011). Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. *Trends in biotechnology*, 29 (10): 499-508.
- Davidson, J., Rosenkrands, I., Christensen, D., Vangala, A., Kirby, D., Perrie, Y., Agger, E. M. & Andersen, P. (2005). Characterization of cationic liposomes based on dimethyldioctadecylammonium and synthetic cord factor from *M. tuberculosis* (trehalose 6, 6'-dibehenate)—a novel adjuvant inducing both strong CMI and antibody responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1718 (1): 22-31.
- De Ruyter, P., Kuipers, O. P. & De Vos, W. M. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Applied and environmental microbiology*, 62 (10): 3662-3667.
- De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M. & de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16 (9): 1018-1028.
- Derrien, M. & van Hylckama Vlieg, J. E. (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in microbiology*, 23 (6): 354-366.
- des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.-J. & Pr at, V. (2006). Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *Journal of controlled release*, 116 (1): 1-27.
- Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Collins, K. & Ross, R. P. (2001). Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal*, 11 (10): 801-808.
- Desmond, C., Fitzgerald, G., Stanton, C. & Ross, R. (2004). Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Applied and environmental microbiology*, 70 (10): 5929-5936.
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I. & H ebraud, M. (2006). Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS microbiology letters*, 256 (1): 1-15.
- Dieye, Y., Usai, S., Clier, F., Gruss, A. & Piard, J.-C. (2001). Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *Journal of bacteriology*, 183 (14): 4157-4166.
- Driessen, A. J. & Nouwen, N. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.*, 77: 643-667.
- Eijsink, V., Brurberg, M. B., Middelhoven, P. H. & Nes, I. F. (1996). Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *Journal of Bacteriology*, 178 (8): 2232-2237.

- Eijsink, V. G., Axelsson, L., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Holo, H. & Nes, I. F. (2002). Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81 (1-4): 639-654.
- Elwell, C., Mirrashidi, K. & Engel, J. (2016). Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 14 (6): 385-400.
- Emerson, P. M., Bailey, R. L., Mahdi, O. S., Walraven, G. E. & Lindsay, S. W. (2000). Transmission ecology of the fly *Musca sorbens*, a putative vector of trachoma. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94 (1): 28-32.
- Eriksson, K. & Holmgren, J. (2002). Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Current opinion in immunology*, 14 (5): 666-672.
- Farris, C. M. & Morrison, R. P. (2011). Vaccination against Chlamydia Genital Infection Utilizing the Murine *C. muridarum* Model. *Infection and Immunity*, 79 (3): 986.
- Fischetti, V., Pancholi, V. & Schneewind, O. (1990). Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Molecular microbiology*, 4 (9): 1603-1605.
- Foged, C., Sundblad, A. & Hovgaard, L. (2002). Targeting vaccines to dendritic cells. *Pharmaceutical research*, 19 (3): 229-238.
- Folkehelseinstituttet. (2016). *Chlamydiainfeksjon, genital (klamydia) - veileder for helsepersonell*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/chlamydiainfeksjon-genital-klamydia/#forebyggende-tiltak-og-kontroll>.
- Fredriksen, L., Mathiesen, G., Sioud, M. & Eijsink, V. G. (2010). Cell wall anchoring of the 37-kilodalton oncofetal antigen by *Lactobacillus plantarum* for mucosal cancer vaccine delivery. *Applied and environmental microbiology*, 76 (21): 7359-7362.
- Fredriksen, L., Kleiveland, C. R., Hult, L. T. O., Lea, T., Nygaard, C. S., Eijsink, V. G. & Mathiesen, G. (2012). Surface display of N-terminally anchored invasin by *Lactobacillus plantarum* activates NF- $\kappa$ B in monocytes. *Applied and environmental microbiology*, 78 (16): 5864-5871.
- Gambhir, M., Basáñez, M.-G., Turner, F., Kumaresan, J. & Grassly, N. C. (2007). Trachoma: transmission, infection, and control. *The Lancet infectious diseases*, 7 (6): 420-427.
- Gottlieb, S. L., Low, N., Newman, L. M., Bolan, G., Kamb, M. & Broutet, N. (2014). Toward global prevention of sexually transmitted infections (STIs): the need for STI vaccines. *Vaccine*, 32 (14): 1527-1535.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. & Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology*, 20 (1): 621-667.
- Guimarães, V., Innocentin, S., Chatel, J.-M., Lefèvre, F., Langella, P., Azevedo, V. & Miyoshi, A. (2009). A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genetic vaccines and therapy*, 7 (1): 1.
- Hafner, L. M. & Pelzer, E. S. (2011). *Tubal damage, infertility and tubal ectopic pregnancy: chlamydia trachomatis and other microbial aetiologies*: INTECH Open Access Publisher.
- Hafner, L. M., Wilson, D. P. & Timms, P. (2014). Development status and future prospects for a vaccine against *Chlamydia trachomatis* infection. *Vaccine*, 32 (14): 1563-1571.
- Hammerschlag, M. R. (2004). *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* infections in children and adolescents. *Pediatrics in review/American Academy of Pediatrics*, 25 (2): 43.
- Hansen, J., Jensen, K. T., Follmann, F., Agger, E. M., Theisen, M. & Andersen, P. (2008). Liposome delivery of *Chlamydia muridarum* major outer membrane protein primes a

- Th1 response that protects against genital chlamydial infection in a mouse model. *Journal of Infectious Diseases*, 198 (5): 758-767.
- Heidebrecht, F., Heidebrecht, A., Schulz, I., Behrens, S.-E. & Bader, A. (2009). Improved semiquantitative Western blot technique with increased quantification range. *Journal of immunological methods*, 345 (1): 40-48.
- Herias, M., Hessele, C., Telemo, E., Midtvedt, T., Hanson, L. & Wold, A. (1999). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. *Clinical and experimental immunology*, 116 (2): 283-290.
- Herich, R. & Levkut, M. (2002). Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *VETERINARNI MEDICINA-PRAHA-*, 47 (6): 169-180.
- Hervouet, C., Luci, C., Çuburu, N., Cremel, M., Bekri, S., Vimeux, L., Marañon, C., Czerkinsky, C., Hosmalin, A. & Anjuère, F. (2010). Sublingual immunization with an HIV subunit vaccine induces antibodies and cytotoxic T cells in the mouse female genital tract. *Vaccine*, 28 (34): 5582-5590.
- Holmgren, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K. & Mharandi, A. (2003). Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine*, 21: S89-S95.
- Holmgren, J. & Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine*, 11: S45-S53.
- Hutchings, M. I., Palmer, T., Harrington, D. J. & Sutcliffe, I. C. (2009). Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold ‘em, knowing when to fold ‘em. *Trends in microbiology*, 17 (1): 13-21.
- Johansson, E.-L., Rask, C., Fredriksson, M., Eriksson, K., Czerkinsky, C. & Holmgren, J. (1998). Antibodies and antibody-secreting cells in the female genital tract after vaginal or intranasal immunization with cholera toxin B subunit or conjugates. *Infection and immunity*, 66 (2): 514-520.
- Johansson, E.-L., Wassén, L., Holmgren, J., Jertborn, M. & Rudin, A. (2001). Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. *Infection and immunity*, 69 (12): 7481-7486.
- Kajikawa, A., Nordone, S. K., Zhang, L., Stoeker, L. L., LaVoy, A. S., Klaenhammer, T. R. & Dean, G. A. (2011). Dissimilar properties of two recombinant *Lactobacillus acidophilus* strains displaying *Salmonella* FliC with different anchoring motifs. *Applied and environmental microbiology*, 77 (18): 6587-6596.
- Kaufmann, S. H., Hussey, G. & Lambert, P.-H. (2010). New vaccines for tuberculosis. *The Lancet*, 375 (9731): 2110-2119.
- Kawana, K., Adachi, K., Kojima, S., Taguchi, A., Tomio, K., Yamashita, A., Nishida, H., Nagasaka, K., Arimoto, T. & Yokoyama, T. (2014). Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. *Vaccine*, 32 (47): 6233-6239.
- Kim, S.-K. & DeMars, R. (2001). Epitope clusters in the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Current opinion in immunology*, 13 (4): 429-436.
- Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M. M., Vaughan, E. E., De Vos, W. M. & Kuipers, O. P. (1997). Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Applied and environmental microbiology*, 63 (11): 4581-4584.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M. & Fiers, M. W. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (4): 1990-1995.

- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J. & Bron, P. A. (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS microbiology reviews*, 34 (2): 199-230.
- Kozlowski, P. A., Williams, S. B., Lynch, R. M., Flanigan, T. P., Patterson, R. R., Cu-Uvin, S. & Neutra, M. R. (2002). Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle. *The Journal of Immunology*, 169 (1): 566-574.
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P. G., Luesink, E. J. & de Vos, W. M. (1995). Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (45): 27299-27304.
- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*: Fagbokforlag.
- Lian, T. & Hø, R. J. (2001). Trends and developments in liposome drug delivery systems. *Journal of pharmaceutical sciences*, 90 (6): 667-680.
- Liu, X., Lagenaur, L. A., Simpson, D. A., Essenmacher, K. P., Frazier-Parker, C. L., Liu, Y., Tsai, D., Rao, S. S., Hamer, D. H. & Parks, T. P. (2006). Engineered vaginal lactobacillus strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor cyanovirin-N. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50 (10): 3250-3259.
- Lulko, A. T., Veening, J.-W., Buist, G., Smits, W. K., Blom, E. J., Beekman, A. C., Bron, S. & Kuipers, O. P. (2007). Production and secretion stress caused by overexpression of heterologous  $\alpha$ -amylase leads to inhibition of sporulation and a prolonged motile phase in *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*, 73 (16): 5354-5362.
- Lysén, M., Österlund, A., Rubin, C.-J., Persson, T., Persson, I. & Herrmann, B. (2004). Characterization of ompA genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infections during 1 year of contact tracing in a Swedish County. *Journal of clinical microbiology*, 42 (4): 1641-1647.
- Machado, A. C., Bandea, C. I., Alves, M. F., Joseph, K., Igietseme, J., Miranda, A. E., Guimarães, E. M., Turchi, M. D. & Black, C. M. (2011). Distribution of *Chlamydia trachomatis* genovars among youths and adults in Brazil. *Journal of medical microbiology*, 60 (4): 472-476.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V. & Polouchine, N. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (42): 15611-15616.
- Malhotra, M., Sood, S., Mukherjee, A., Muralidhar, S. & Bala, M. (2013). Genital *Chlamydia trachomatis*: an update. *The Indian journal of medical research*, 138 (3): 303.
- Mathiesen, G., Sveen, A., Piard, J. C., Axelsson, L. & Eijsink, V. (2008). Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides. *Journal of applied microbiology*, 105 (1): 215-226.
- Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H. & Schneewind, O. (1999). Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, 285 (5428): 760-763.
- Medina, E. & Guzmán, C. A. (2000). Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 27 (4): 305-311.
- Medina, E. & Guzmán, C. A. (2001). Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine*, 19 (13): 1573-1580.
- Michon, C., Langella, P., Eijsink, V., Mathiesen, G. & Chatel, J. (2016). Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications. *Microbial cell factories*, 15 (1): 1.

- Mierau, I. & Kleerebezem, M. (2005). 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 68 (6): 705-717.
- Mohamadzadeh, M., Olson, S., Kalina, W. V., Ruthel, G., Demmin, G. L., Warfield, K. L., Bavari, S. & Klaenhammer, T. R. (2005). Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (8): 2880-2885.
- Mohamadzadeh, M., Duong, T., Sandwick, S., Hoover, T. & Klaenhammer, T. (2009). Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (11): 4331-4336.
- Moore, E. R. & Ouellette, S. P. (2014). Reconceptualizing the chlamydial inclusion as a pathogen-specified parasitic organelle: an expanded role for Inc proteins. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4: 157.
- Mossman, D., Beagley, K. W., Landay, A. L., Loewenthal, M., Ooi, C., Timms, P. & Boyle, M. (2008). Genotyping of urogenital *Chlamydia trachomatis* in Regional New South Wales, Australia. *Sexually transmitted diseases*, 35 (6): 614-616.
- Murray, C. J., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A. D., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J. A. & Abdalla, S. (2013). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The lancet*, 380 (9859): 2197-2223.
- Neutra, M. R. & Kozlowski, P. A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature Reviews Immunology*, 6 (2): 148-158.
- Olsen, A. W., Follmann, F., Erneholt, K., Rosenkrands, I. & Andersen, P. (2015). Protection against *Chlamydia trachomatis* infection and upper genital tract pathological changes by vaccine-promoted neutralizing antibodies directed to the VD4 of the major outer membrane protein. *Journal of Infectious Diseases*: jiv137.
- Organization, W. H. (2016). *Trachoma*. Tilgjengelig fra: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs382/en/>.
- Ortiz, L., Angevine, M., Kim, S.-K., Watkins, D. & DeMars, R. (2000). T-Cell Epitopes in Variable Segments of *Chlamydia trachomatis* Major Outer Membrane Protein Elicit Serovar-Specific Immune Responses in Infected Humans. *Infection and immunity*, 68 (3): 1719-1723.
- Pal, S., Peterson, E. M. & Luis, M. (2005). Vaccination with the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein can elicit an immune response as protective as that resulting from inoculation with live bacteria. *Infection and immunity*, 73 (12): 8153-8160.
- Pavan, S., Hols, P., Delcour, J., Geoffroy, M.-C., Grangette, C., Kleerebezem, M. & Mercenier, A. (2000). Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study in vivo biological effects. *Applied and environmental microbiology*, 66 (10): 4427-4432.
- Piard, J., Hautefort, I., Fischetti, V., Ehrlich, S., Fons, M. & Gruss, A. (1997). Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *Journal of bacteriology*, 179 (9): 3068-3072.
- Prágai, Z., Tjalsma, H., Bolhuis, A., van Dijl, J. M., Venema, G. & Bron, S. (1997). The signal peptidase II (Isp) gene of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 143 (4): 1327-1333.
- Prasad, J., McJarrow, P. & Gopal, P. (2003). Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Applied and environmental microbiology*, 69 (2): 917-925.

- Quadri, L. E. (2002). Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82 (1-4): 133-145.
- Ramu, R., Shirahatti, P. S., Devi, A. T. & Prasad, A. (2015). Bacteriocins and their applications in food preservation. *Critical reviews in food science and nutrition* (just-accepted): 00-00.
- Rasmussen, S. J., Eckmann, L., Quayle, A. J., Shen, L., Zhang, Y.-X., Anderson, D. J., Fierer, J., Stephens, R. S. & Kagnoff, M. F. (1997). Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 99 (1): 77.
- Schnell, N., Entian, K.-D., Schneider, U., Götz, F., Zähner, H., Kellner, R. & Jung, G. (1988). Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature*, 333 (6170): 276-278.
- Seavey, M. M. & Mosmann, T. R. (2009). Estradiol-induced vaginal mucus inhibits antigen penetration and CD8+ T cell priming in response to intravaginal immunization. *Vaccine*, 27 (17): 2342-2349.
- Solberg, E. (2015). *Targeting of lactobacillus to M-cells to improve its potential as vaccine delivery vector*.
- Soomro, A., Masud, T. & Anwaar, K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1 (1): 20-24.
- Steidler, L., Neiryneck, S., Huyghebaert, N., Snoeck, V., Vermeire, A., Goddeeris, B., Cox, E., Remon, J. P. & Remaut, E. (2003). Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nature biotechnology*, 21 (7): 785-789.
- Stephens, R. S., Wagar, E. A. & Schoolnik, G. (1988). High-resolution mapping of serovar-specific and common antigenic determinants of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *The Journal of experimental medicine*, 167 (3): 817-831.
- Su, H. & Caldwell, H. D. (1993). Immunogenicity of a synthetic oligopeptide corresponding to antigenically common T-helper and B-cell neutralizing epitopes of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Vaccine*, 11 (11): 1159-1166.
- Su, J., Li, J., Zheng, H., You, Y., Luo, X., Li, Y., Li, X., Ma, X., Li, J. & Dou, Y. (2014). Adjuvant Effects of *L. acidophilus* LW1 on Immune Responses to the Foot-and-Mouth Disease Virus DNA Vaccine in Mice. *PloS one*, 9 (8).
- Sutcliffe, I. C. & Harrington, D. J. (2002). Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology*, 148 (7): 2065-2077.
- Sørvig, E., Grönqvist, S., Naterstad, K., Mathiesen, G., Eijsink, V. G. & Axelsson, L. (2003). Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. *FEMS microbiology letters*, 229 (1): 119-126.
- Sørvig, E., Mathiesen, G., Naterstad, K., Eijsink, V. G. & Axelsson, L. (2005). High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology*, 151 (7): 2439-2449.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S. & van Dijl, J. M. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (3): 515-547.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D., Braun, P. G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J.-Y. F., Westers, H., Zanen, G. & Quax, W. J. (2004). Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (2): 207-233.

- Tjåland, R. (2011). *Secretion and anchoring of Mycobacterium tuberculosis antigens in Lactobacillus plantarum*.
- Trumpfheller, C., Longhi, M. P., Caskey, M., Idoyaga, J., Bozzacco, L., Keler, T., Schlesinger, S. J. & Steinman, R. M. (2012). Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity. *Journal of internal medicine*, 271 (2): 183-192.
- Urdal, G. K. (2013). *Anchoring of a Human Immunodeficiency Virus antigen to the surface of Lactobacillus plantarum*.
- van der Lubben, I. M., Verhoef, J. C., Borchard, G. & Junginger, H. E. (2001). Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14 (3): 201-207.
- van Roosmalen, M. L., Geukens, N., Jongbloed, J. D., Tjalsma, H., Dubois, J.-Y. F., Bron, S., van Dijl, J. M. & Anné, J. (2004). Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1694 (1): 279-297.
- Vesa, T., Pochart, P. & Marteau, P. (2000). Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 14 (6): 823-828.
- von Heijne, G. (1989). The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. *Protein engineering*, 2 (7): 531-534.
- Wang, M., Gao, Z., Zhang, Y. & Pan, L. (2016). Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. *Applied microbiology and biotechnology*: 1-11.
- Wells, J. (2011). Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria. *Annual review of food science and technology*, 2: 423-445.
- Wells, J. M. & Mercenier, A. (2008). Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6 (5): 349-362.
- Wyszyńska, A., Kobierecka, P., Bardowski, J. & Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2015). Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Applied microbiology and biotechnology*, 99 (7): 2967-2977.
- Zotta, T., Ricciardi, A., Guidone, A., Sacco, M., Muscariello, L., Mazzeo, M. F., Cacace, G. & Parente, E. (2012). Inactivation of *ccpA* and aeration affect growth, metabolite production and stress tolerance in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *International journal of food microbiology*, 155 (1): 51-59.
- Øverland, L. (2013). *Secretion and anchoring of proteins in Lactobacillus plantarum: Studies of a dendritic cell-targeted Mycobacterium tuberculosis antigen*.

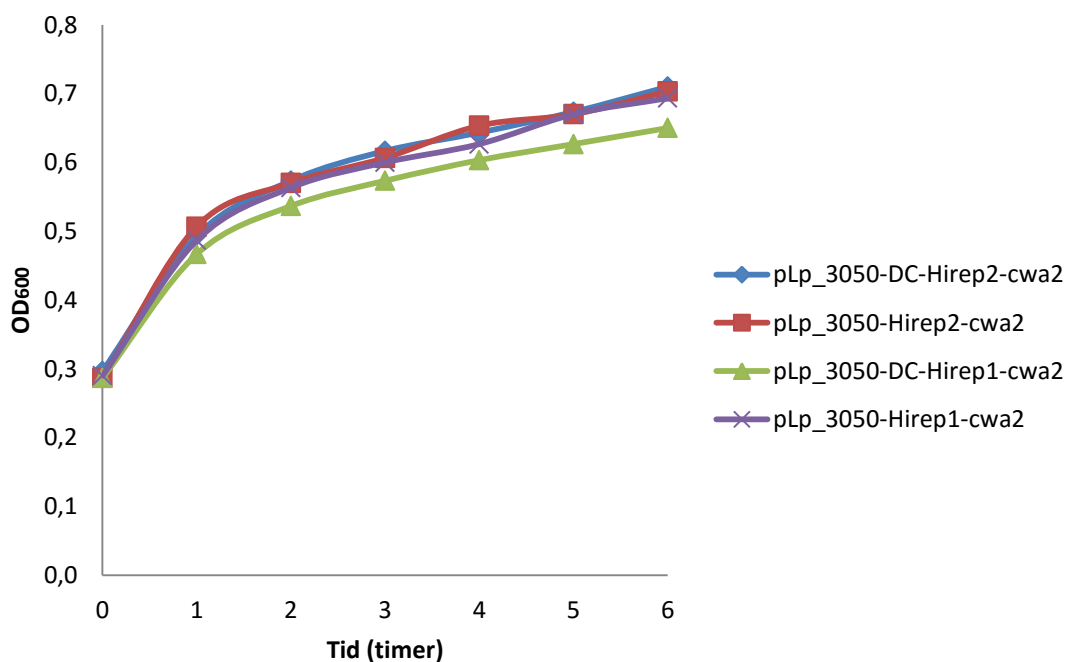


## Vedlegg

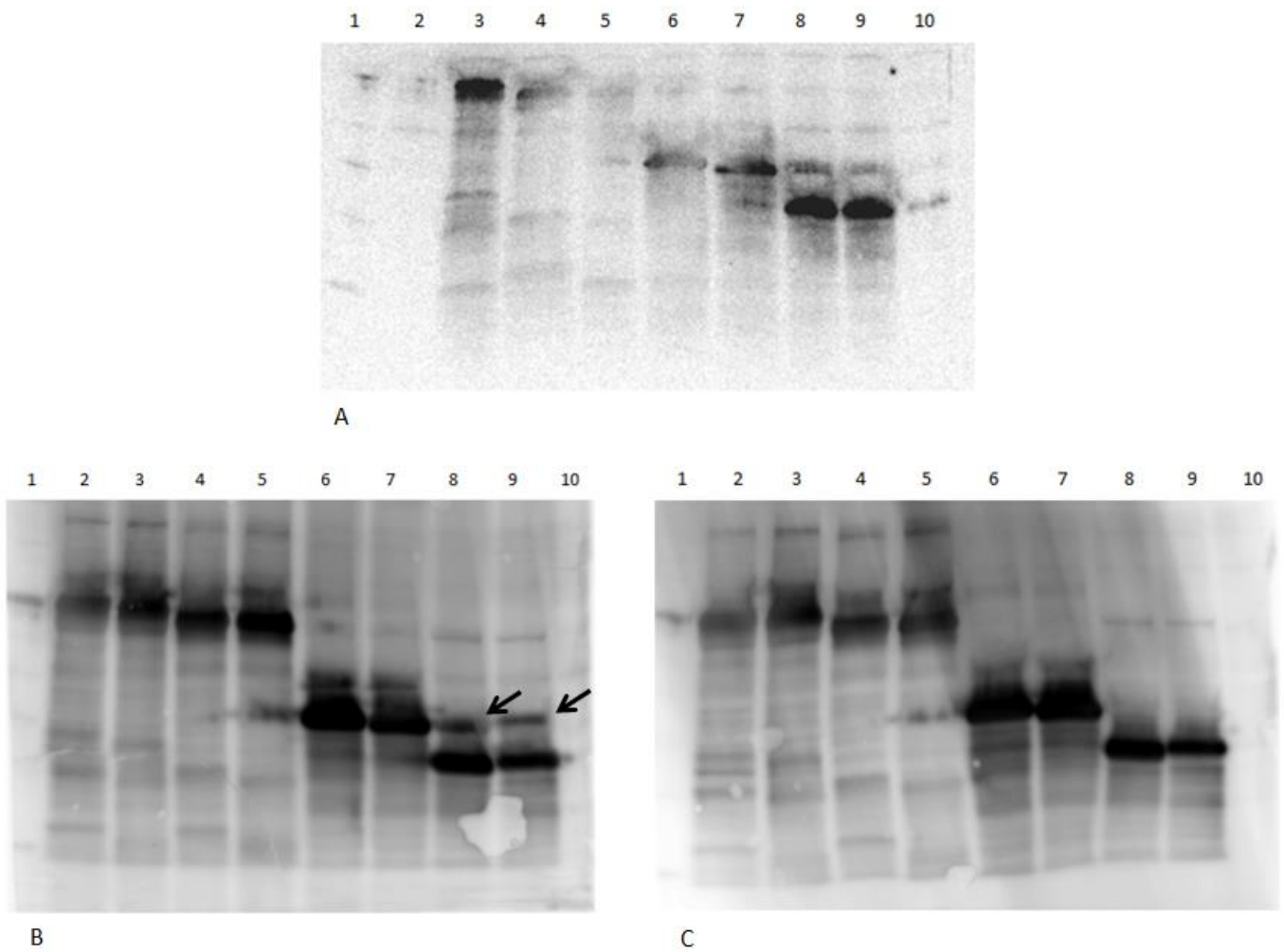
**Tabell V-1. CFU/ml og OD<sub>600</sub> for rekombinante *L. plantarum* ved høstingstidspunktet (tre timer etter indusering).** For hver parallell ble CFU/ml dividert på OD<sub>600</sub>, og gjennomsnittet av disse forholdstallene ble benyttet til beregning av hvor stort volum bakteriekultur som måtte sentrifugeres for å høste en spesifikk mengde bakterier.

	Parallell 1		Parallell 2		Parallell 3		Parallell 4		Gj.snitt forholdstall
	CFU/ml	OD	CFU/ml	OD	CFU/ml	OD	CFU/ml	OD	
pLp_3050-DC-Hirep2-cwa2	1,33E+08	0,64	2,39E+08	0,73					2,68E+08
pLp_3050-Hirep2-cwa2	7,50E+07	0,58	2,16E+08	0,67					2,26E+08
pLp_3050-DC-Hirep1-cwa2	1,78E+08	0,60	1,45E+08	0,57					2,76E+08
pLp_3050-Hirep1-cwa2	1,54E+08	0,60	1,75E+08	0,64					2,65E+08
pLp_1261-Hirep2-DC	5,30E+08	1,90	9,00E+08	1,80	9,70E+08	1,80	9,77E+08	1,70	4,73E+08
pLp_1261-Hirep2	2,43E+08	2,10	1,03E+09	2,10	9,53E+08	2,00	1,02E+09	1,80	4,12E+08
pLp_1261-Hirep1-DC	7,57E+08	1,90	1,13E+09	2,10	1,22E+09	1,90	1,06E+09	1,80	5,42E+08
pLp_1261-Hirep1	1,19E+09	2,40	9,33E+08	2,00	1,22E+09	2,00	1,17E+09	2,00	5,39E+08
Pev	1,29E+09	2,60	1,37E+09	2,80	1,45E+09	2,60	1,48E+09	2,60	5,28E+08

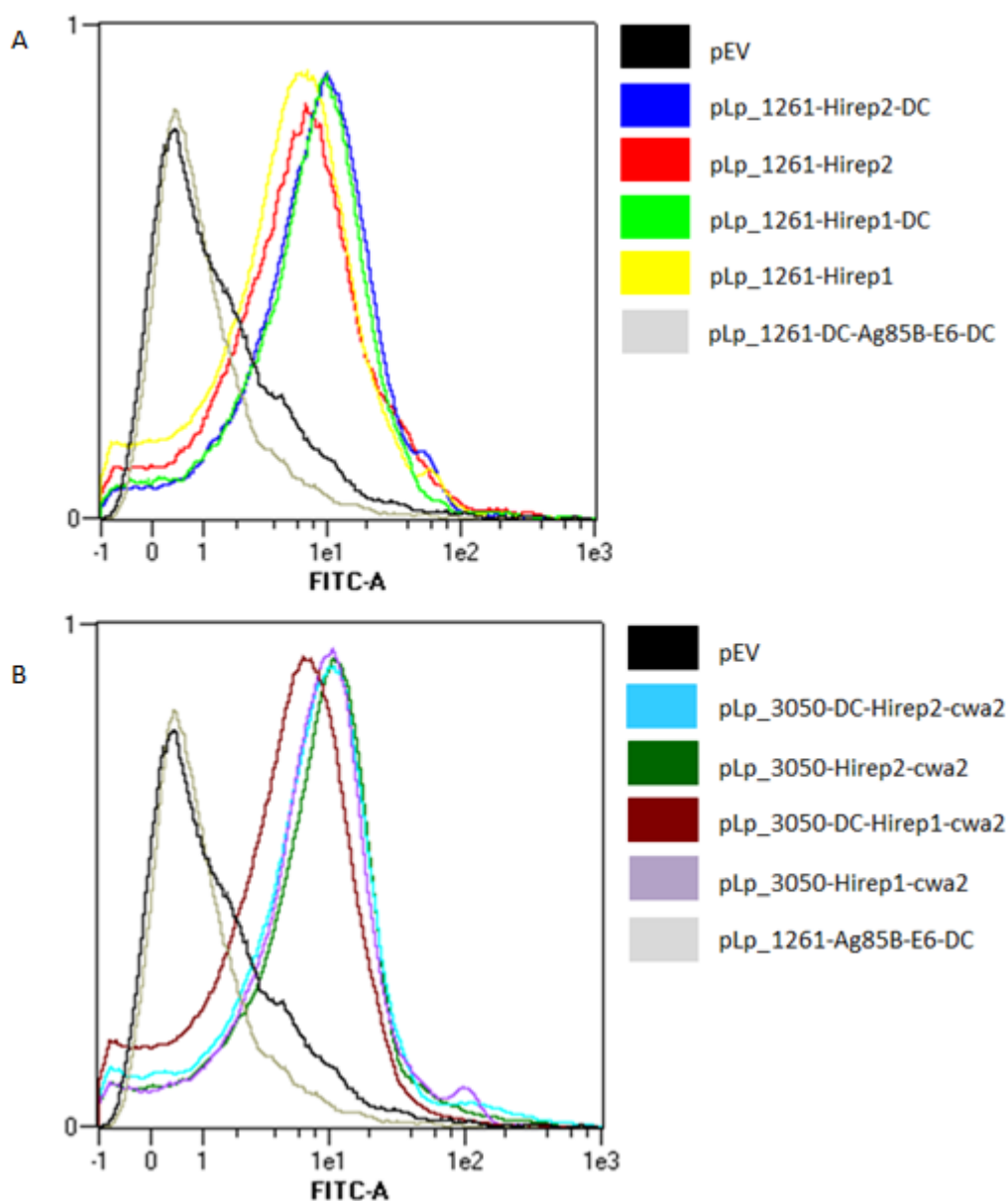
Forklaring: OD = OD<sub>600</sub>; Gj.snitt forholdstall = gjennomsnittet av forholdet mellom CFU/ml og OD<sub>600</sub> i hver parallell.



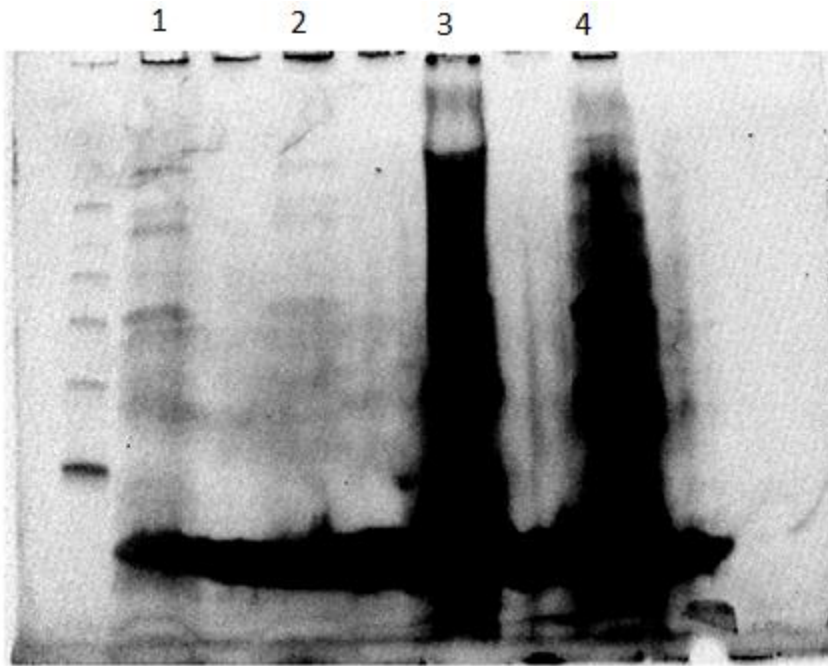
**Figur V-1. Vekstkurver for rekombinante *L. plantarum* med plasmider for celleveggankring av antigener.** Bakteriene ble induisert med SppIP ved tidspunkt 0 (OD<sub>600</sub> ~ 0,3). Etter induksjon ble OD<sub>600</sub> målt hver time i til sammen seks timer.



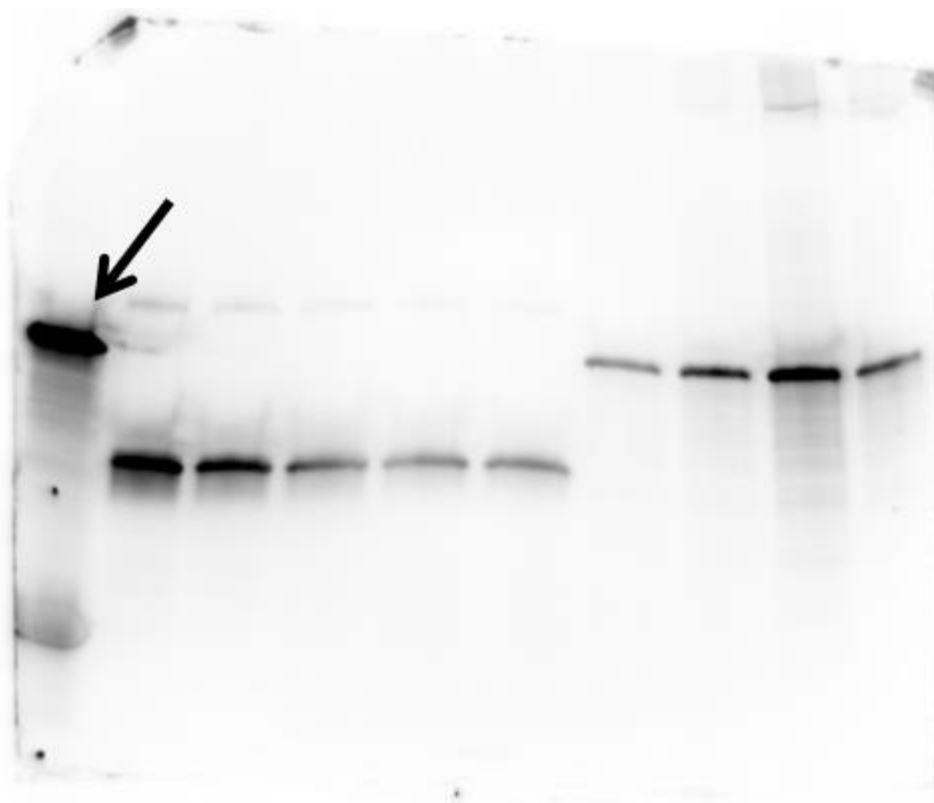
**Figur V-2. Optimalisering av Western blot-analyser av cellefritt ekstrakt fra rekombinante *L. plantarum*.** A) analyse utført ved SNAP i.d.® immundeteksjon-systemet for antistoffhybridisering (seksjon 3.15.2.); B) analyse utført ved tradisjonell metode for antistoffhybridisering (seksjon 3.15.3.) med BSA i blokkeringsløsningen. Pilene indikerer bånd forårsaket av uspesifikk binding av primærantistoffet; C) analyse utført ved tradisjonell metode for antistoffhybridisering med tørrmelk i blokkeringsløsningen. Følgende nummerering gjelder for A-C: (1) MagicMark™ XP Western Protein Standard; (2) pLp\_3050-DC-Hirep2-cwa2; (3) pLp\_3050-Hirep2-cwa2; (4) pLp\_3050-DC-Hirep1-cwa2; (5) pLp\_3050-Hirep1-cwa2; (6) pLp\_1261-Hirep2-DC; (7) pLp\_1261-Hirep2; (8) pLp\_1261-Hirep1-DC; (9) pLp\_1261-Hirep1; (10) pEV.



**Figur V-3. Strømningscytometri av rekombinante *L. plantarum*.** A) resultater fra strømningscytometri av *L. plantarum* med ankring av antigenene til cellemembranen, samt kontrollene pEV og pLp\_1261-Ag85B-E6-DC; B) resultater fra strømningscytometri av *L. plantarum* med ankring av antigenene til celleveggen og kontrollene pEV og pLp\_1261-Ag85B-E6-DC. Analysen bekrefter at primærantistoffet ikke binder til lipoprotein-ankeret, da fluorescerende signal ikke ble detektert hos *L. plantarum* med pLp\_1261-Ag85B-E6-DC. X-aksen viser intensiteten på det fluorescerende signalet. Fargekodene for de ulike konstruktene er angitt i figuren.



**Figur V-4. Proteingelektroforese av cellelysat.** To ulike metoder ble testet for å undersøke hva som var beste lyseringsmetode. Den ene metoden baserte seg på å gi bakteriene et kulde-varmesjokk og den andre behandling av bakteriene med lysozym og mutanolysin. Bakteriene var rekombinante *L. plantarum* med pLp\_1261-Hirep2-DC. (1) Kulde-varmesjokk 1:20; (2) Kulde-varmesjokk 1:50; (3) Lysozym/mutanolysin-behandlet 1:20; (4) Lysozym/mutanolysin-behandlet 1:20. Hvilken behandling, samt fortyningen av bakteriesuspensjonen, er angitt.



**Figur V-5. Western blot for deteksjon av Hirep2-DC i supernatant etter behandling av *L. plantarum* pLp\_1261-Hirep2-DC med lysozym og mutanolysin.** Lysering av rekombinante *L. plantarum* ble fastslått å være mest vellykket ved lysozym- og mutanolysin-behandling. En Western blot-analyse, der 10 µl av supernatanten (etter lyseringsbehandlingen) ble kjørt på proteingelelektroforese i forkant av blottingen. Pilen indikerer supernatant-prøven.

**Tabell V-2. Rådata levert fra AzureSpot.** Kjente konsentrasjoner av Hirep1 i prøve 1-5 ble oppgitt i picogram (Calib Volume). De resterende verdiene ble beregnet av programmet.

Prøve	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Volume	2,05E+08	1,16E+08	88544452	52939597	28322166	160004919	87025602	26994572	38959271
Calib Volume (pg)	20000	10000	7500	5000	2500	15096,58	7910,13	1998,72	3176,92

**Tabell V-3. Utregning av konsentrasjonsestimat for Hirep2-DC.** AzureSport beregnet mengden picogram for hver prøve, og denne mengden ble dividert på 5 (mengden prøve applisert på polyakrylamidgel). Bakteriecelle ble resuspendert i 125 µl GTE-buffert med lysozym (10 mg/ml) og mutanolysin (15 U/ml), derav fortynningsfaktor 125. Av denne løsningen ble det laget en fortynningsrekke med forholdene 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 og 1:60, beregnet mengde ble dermed multiplisert med fortynningsfaktorene. Gjennomsnitt basert på prøve 6, 7 og 9 da prøve 8 avviker fra fortynningsrekken.

	<b>Prøve 6</b>	<b>Prøve 7</b>	<b>Prøve 8</b>	<b>Prøve 9</b>
	Calib Vol(pg) 15096,58	Calib Vol(pg) 7910,13	Calib Vol(pg) 1998,72	Calib Vol(pg) 3176,92
Fortynningsfaktor	20	30	40	50
/ul på gel	3019,316	1582,026	399,744	635,384
*fortynningsfaktor	60386,32	47460,78	15989,76	31769,2
*125ul	7548290	5932597,5	1998720	3971150
ng	7548,29	5932,5975	1998,72	3971,15
µg	7,54829	5,9325975	<del>1,99872</del>	3,97115
Gjennomsnitt	5,817345833 µg			



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway